

# UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie  
Studijní obor: Analytická chemie



Eva Háková

Určování poloh dvojných vazeb u triacylglycerolů pomocí HPLC/APCI-MS<sup>2</sup>

Localization of double bond positions in triacylglycerols using HPLC/APCI-MS<sup>2</sup>

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.

Konzultantka: RNDr. Karolina Pecková, Ph.D.

Praha 2013

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a grantů GAČR (203/09/0139 a P206/12/750).

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. je možné pouze po písemném souhlasu těchto institucí.

V Praze dne

## Abstrakt

Triacylglyceroly se řadí k jedné z nejhojněji zastoupené lipidové třídy. Jejich chemické, fyzikální i biologické vlastnosti se liší v závislosti na stupni nenasycenosti a polohách dvojných vazeb v acylech. Tato diplomová práce byla zaměřena na lokalizaci dvojných vazeb s využitím tandemové hmotnostní spektrometrie s chemickou ionizací za atmosférického tlaku. Bylo studováno 14 standardů a 44 směsí standardů triacylglycerolů s lišícím se počtem dvojných vazeb i délkou uhlovodíkového řetězce v acylech. Standardy byly získány z komerčních zdrojů a připraveny randomizačními reakcemi v mikroměřítku. Umístění dvojných vazeb se podařilo určit fragmentací molekulárního aduktu s  $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}^+$  ( $[\text{M}+55]^+$ ) vznikajícího za přítomnosti acetonitrilu v mobilní fázi. Tato metoda byla posléze aplikována při HPLC/MS analýzách přírodních směsí.

**Klíčová slova:** triacylglyceroly, randomizace, určení polohy dvojné vazby, chemická ionizace za atmosférického tlaku, hmotnostní spektrometrie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí

## Abstract

Triacylglycerols are among the most abundant classes of lipid. Their chemical, physical and biological characteristics depend on degree of unsaturation and positions of double bonds in acyls. This thesis was focused on localization of double bonds using tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. We studied 14 standards and 44 standard mixtures with different number of double bonds and length of hydrocarbon chain in acyls. Standards were obtained from commercial sources and prepared of randomizations reaction in microscale. Localization of double bonds was deduced from fragments of molecular adduct with  $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}^+$  ( $[\text{M}+55]^+$ ) created in presence of acetonitrile in the mobile phase. This method was applied for HPLC/MS analysis of natural mixtures of triacylglycerols.

**Key words:** triacylglycerols, randomization, localization of double bonds, atmospheric pressure chemical ionization, mass spectrometry, high performance liquid chromatography with mass detection

## Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Josefu Cvačkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady i připomínky a všestrannou pomoc při vypracování této diplomové práce. Dále své konzultantce RNDr. Karolině Peckové, Ph.D. za odbornou pomoc. Velký dík patří rovněž celému týmu Hmotnostní spektrometrie Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. zvláště RNDr. Vladimíru Vrkoslavovi, Ph.D. za ochotu, praktické rady a za vytvoření velice přátelské atmosféry na tomto pracovišti.



# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>10</b>
1.1	Cíl práce.....	10
<b>2</b>	<b>Teoretická část .....</b>	<b>11</b>
2.1	Lipidy.....	11
2.1.1	Triacylglyceroly.....	12
2.1.1.1	Výskyt a funkce triacylglycerolů.....	12
2.2	Hmotnostní spektrometrie lipidů.....	13
2.2.1	Chemická ionizace za atmosférického tlaku.....	14
2.2.1.1	Reakce probíhající během chemické ionizace za atmosférického tlaku.....	15
2.2.2	Sférická iontová past .....	16
2.2.3	Chromatografické techniky ve spojení s hmotnostní spektrometrií.....	17
2.2.3.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí.....	17
2.2.3.2	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí .....	18
2.3	Určování poloh dvojných vazeb u triacylglycerolů.....	19
2.3.1	Chemická ionizace kovalentních aduktů .....	19
2.3.2	Vysokoenergetická kolizně indukovaná disociace.....	19
2.3.3	Nízkoenergetická kolizně indukovaná disociace .....	20
2.3.4	Ozonově indukovaná disociace.....	20
2.4	Novorozenecký mázek .....	20
2.4.1	Složení novorozeneckého mázku.....	20
2.4.1.1	Lipidy .....	20
2.4.1.2	Proteiny .....	21
2.4.2	Biologická funkce novorozeneckého mázku .....	21
2.4.3	Diagnostická funkce novorozeneckého mázku a jeho možné využití.....	22
<b>3</b>	<b>Experimentální část .....</b>	<b>23</b>
3.1	Použité chemikálie.....	23
3.2	Použitý materiál.....	24
3.3	Použité biologické vzorky .....	24
3.4	Přístroje a zařízení.....	24
3.5	Pracovní postupy.....	25
3.5.1	Argentační tenkovrstvá chromatografie.....	25
3.5.2	Hmotnostní spektrometrie s přímým zaváděním vzorku.....	25
3.5.3	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí .....	26
3.5.3.1	Rostlinné oleje.....	26
3.5.3.2	Novorozenecký mázek .....	27

3.5.4	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí.....	28
3.5.5	Randomizace triacylglycerolů v mikroměřítu.....	28
3.5.6	Tenkovrstvá chromatografie .....	28
3.5.6.1	Analytická tenkovrstvá chromatografie.....	28
3.5.6.2	Preparativní a semipreparativní tenkovrstvá chromatografie .....	29
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuze .....</b>	<b>30</b>
4.1	APCI-MS standardů triacylglycerolů.....	30
4.2	APCI-MS standardů triacylglycerolů připravených randomizací .....	38
4.2.1	Optimalizace randomizace .....	39
4.2.2	GC/MS methylesterů mastných kyselin .....	40
4.2.3	APCI-MS vzorků připravených randomizací .....	41
4.3	HPLC-MS přírodních směsí.....	49
4.3.1	Postup vyhodnocování HPLC/APCI-MS <sup>2</sup> analýz přírodních směsí.....	49
4.3.2	HPLC/APCI-MS <sup>2</sup> analýzy olivového oleje .....	50
4.3.3	HPLC/APCI-MS <sup>2</sup> analýzy oleje z černého rybízu .....	52
4.3.4	HPLC/APCI-MS <sup>2</sup> analýza novorozeneckého mázku .....	55
<b>5</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>Soupis bibliografických citací.....</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>Přílohy.....</b>	<b>65</b>

## Seznam zkratek a symbolů

a.u.	arbitrární jednotka
Ag-HPLC	argentační vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Ag-TLC	argentační tenkovrstvá chromatografie
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
CACI	chemická ionizace za vzniku kovalentních aduktů
CAD	kolizně aktivovaná disociace
CI	chemická ionizace
CID	kolizně indukovaná disociace
CN	počet uhlíkových atomů
CRF	„charge-remote“ fragmentace
DB	počet dvojných vazeb
DCI	desorpční chemická ionizace
ECN	ekvivalentní počet uhlíkových atomů
EI	elektronová ionizace
ESI	elektrosprejová ionizace
FAB	ionizace urychlenými atomy
FAME	methyl ester mastné kyseliny
FA	mastná kyselina
FD	desorpční ionizace polem
GC	plynová chromatografie
HILIC	chromatografie hydrofilních interakcí
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HT-GC	vysokoteplotní plynová chromatografie
$m/z$	poměr hmotnosti ku náboji
MALDI	laserová ionizace/desorpce za spoluúčasti matrice
MIE	(1-methyleneimino)-1-ethylum
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
OzID	ozonově indukovaná disociace
PQD	pulzní Q kolizní indukovaná disociace

QqQ	hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem
Q-TOF	tandemový hybridní hmotnostní spektrometr s kvadrupólem a ortogonálním průletovým hmotnostním analyzátozem
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
SFC	superkritická fluidní chromatografie
TG	triacylglycerol
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TOF	průletový hmotnostní analyzátor
TSP	ionizace termosprejem
VC	vernix caseosa (novorozenecký mázek)

**Bezpečnost práce**

Během této diplomové práce byl často používán chloroform. Vzhledem k jeho negativnímu působení na lidský organismus a životní prostředí byla veškerá manipulace s chloroformem prováděna v digestoři, ochranných rukavicích a laboratorním plášti. Zbylé odpadní rozpouštědlo či roztoky obsahující chloroform byly skladovány ve speciálním neprůsvitném kanystru pro odpadní rozpouštědla a následně přemístěny na místo určené k likvidaci těchto chemikálií.

# 1 Úvod

Základními stavebními jednotkami živé hmoty jsou lipidy spolu s proteiny a sacharidy.<sup>1</sup> Lipidy mají rozhodující roli v buněčné, tkáňové a orgánové fyziologii živých organismů.<sup>2</sup> Jejich hlavní funkce spočívá v akumulaci energie v buňkách a také jsou součástí buněčných struktur. V živočišných organismech jsou nepostradatelné jako aktivní regulátory během signalizace, působí také jako ligandy a mediátory protein-proteinových interakcí v buňkách.<sup>3</sup> Změny v metabolismu lipidů jsou úzce spjaté s chorobami postihujícími lidstvo. Od metabolického syndromu, který zahrnuje i obezitu a inzulin-rezistentní diabetes mellitus, až po srdeční, neurodegenerativní a infekční (hlavně mykobakteriální) nemoci.<sup>2, 4, 5</sup>

Triacylglyceroly patří k jedné z nejběžněji se vyskytujících lipidů jak v rostlinných, tak živočišných buňkách.<sup>6</sup> Mají rovněž významnou nutriční funkci. Většina tuků, které člověk přijímá potravou je ve formě triacylglycerolů, které jsou dále hydrolyzovány. Jejich příjem je důležitý zvláště kvůli obsahu esenciálních mastných kyselin, např. kyseliny linolové.<sup>8</sup>

Již velmi malé změny v chemické struktuře lipidů mohou změnit fyzikální i biochemické vlastnosti dané molekuly. Určení polohy dvojných vazeb je velice důležité z pohledu biologické funkce daného lipidu.<sup>8</sup> Proto znalost přítomnosti, polohy, počtu dvojných vazeb i jejich geometrické izomerie je u lipidů velice důležitá. Lokalizace dvojných vazeb v nenasycených sloučeninách s dlouhým řetězcem je obtížná. Zvláště jsou-li tyto lipidy součástí komplexních směsí, nebo se vyskytují v malém množství.<sup>9</sup>

Tato práce byla zaměřena na určování poloh dvojných vazeb u triacylglycerolů. Byla provedena rozsáhlá studie lokalizace dvojných vazeb u komerčně dostupných standardů i triacylglycerolů připravených randomizační reakcí. Analyzované triacylglyceroly obsahovaly ve své struktuře různý počet dvojných vazeb i rozdílnou délku uhlovodíkového řetězce. Identifikace byla možná díky vytvoření acetonitrilového aduktu  $C_3H_5N^+$ , který byl dále podroben tandemové hmotnostní spektrometrii. Vyvinutá metoda byla aplikována na komplexní přírodní směsi, které byly separovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

## 1.1 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je vývoj metody pro určování poloh dvojných vazeb u triacylglycerolů s využitím tandemové hmotnostní spektrometrie ve spojení s chemickou ionizací za atmosférického tlaku. Dílčí cíle práce jsou:

- Příprava triacylglycerolů procesem randomizace (interesterifikace) v mikroměřítku.
- Studium tvorby fragmentace aduktů s  $C_3H_5N^+$  v APCI zdroji s komerčně dostupnými či syntetizovanými standardy triacylglycerolů s různým počtem dvojných vazeb.
- Navržení HPLC/APCI-MS<sup>2</sup> metody pro analýzu směsí triacylglycerolů.
- Aplikace metody na přírodní směsi (rostlinné oleje a novorozenecský mázek).

## 2 Teoretická část

### 2.1 Lipidy

Díky složitosti a rozmanitosti lipidů došlo v průběhu let k vytvoření řady definic a klasifikačních schémat těchto struktur.<sup>10</sup> Jedna z formulací se opírá o to, že lipidy patří mezi malé přírodní organické molekuly (< 1500 Da) omezeně rozpustné ve vodě, které je možno izolovat z buněk a tkání organismů extrakcí nepolárními rozpouštědly.<sup>11, 12</sup> Přesnější definice řadí lipidy mezi mastné kyseliny, jejich deriváty a látky spojené biosynteticky nebo funkčně s těmito sloučeninami. Další z výčtu definic označuje lipidy za malé hydrofobní či amfipatické molekuly, jež úplně nebo jen z části vznikají kondenzací thioesterů (mastné kyseliny, polyketidy atd.) nebo isoprenových jednotek (prenoly, steroly atd.).<sup>13</sup>

Rozdělení lipidů dle struktury:<sup>10</sup>

- *Mastné acyly*
- *Glycerolipidy*
- *Glycerolfosfolipidy*
- *Sfingolipidy*
- *Steroly*
- *Prenoly*
- *Sacharolipidy*
- *Polyketidy*

Rozdělení lipidů dle složení:<sup>13, 14</sup>

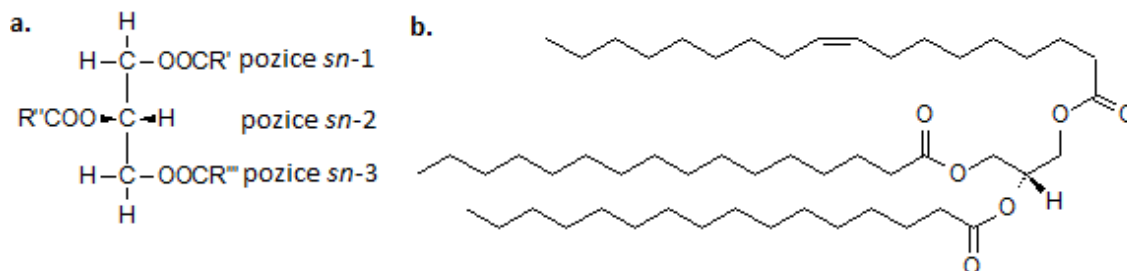
- *Jednoduché lipidy* či *neutrální lipidy* po hydrolýze poskytují jeden až dva typy produktů. Obecně se do této skupiny řadí nepolární lipidy a mastné kyseliny. Spadají zde i studované triacylglyceroly.
- *Komplexní lipidy* tvoří po hydrolýze tři a více složek.
- *Proteolipidy* reprezentují sloučeniny mastných kyselin a proteinů.

Mezi lipidy se řadí tuky, oleje, vosky, některé vitamíny a hormony i většina nebílkovinných složek biologických membrán. Tuky jsou hlavní zásobní formou uhlíku a energie v živočišném organismu.<sup>11, 15</sup> Dále slouží jako izolační bariéra a jsou ochranným obalem organismů a buněk před vnějšími vlivy.<sup>16</sup>

Podrobnější analýza lipidů dala na počátku 21. století vznik novému oboru biomedicínského výzkumu, a to lipidomice.<sup>3, 5</sup> Zabývá se systematickým studiem lipidů a jejich funkcí v biologických systémech.<sup>2</sup>

### 2.1.1 Triacylglyceroly

Triacylglyceroly (dříve také triglyceridy, TGs) jsou estery glycerolu se třemi mastnými kyselinami (FAs), tedy triacylderiváty glycerolu, které se svou strukturou řadí mezi glycerolipidy.<sup>10, 11</sup> Jednoduché TGs obsahují tři shodné FAs. Pokud obsahují dvě nebo tři odlišné FAs, nazývají se tyto TGs smíšené a vykazují optickou aktivitu z důvodu asymetričnosti.<sup>13, 17</sup> TGs mohou obsahovat různé dlouhé uhlovodíkové řetězce s lišícím se počtem dvojných vazeb.<sup>11</sup> Na Obr. 2.1 je zobrazena struktura TG.



Obr. 2.1 Struktura triacylglycerolů. (a) Fisherova projekce obecného triacylglycerolu. (b) 1,2-Dihexadecanoyl-3(*cis*-9-oktadecenoyl)-glycerol. (převzato z <sup>18</sup>, upraveno)

Tato třída lipidů neobsahuje ve své molekule žádnou ionizovatelnou funkční skupinu, tudíž se řadí do skupiny tzv. neutrálních lipidů. Své pojmenování neutrální tuky (pevné) nebo neutrální oleje (kapalné) mají dle svého fyzikálního stavu při teplotě místnosti a daném obsahu různých typů FAs.<sup>15, 16</sup> Rostlinné oleje obsahují většinou nenasycené FAs.<sup>15</sup>

#### 2.1.1.1 Výskyt a funkce triacylglycerolů

V živočišných buňkách jsou TGs uskladněny v tukových buňkách, které jsou nejhojněji zastoupeny v tukové tkáni, kde tvoří tzv. tukovou zásobu. Jejich oxidačním odbouráváním je poskytováno mnohem více energie než v případě sacharidů či proteinů.<sup>15</sup> V živočišném organismu zajišťují ve formě chylomikronů (lipoproteinové částice) transport a distribuci FAs z potravy prostřednictvím lymfatického a krevního systému.<sup>16, 17</sup> V rostlinách mají TGs nejhojnější zastoupení v semenech, kde mohou tvořit až 60 % jejich hmotnosti. Jejich hlavní úloha v rostlinných buňkách je spjata s fází rychlého růstu a vývoje rostliny, jelikož tvoří největší zásobárnu uhlíku. Ve vegetativních tkáních rostlin jsou sice tyto látky zastoupeny minoritně, avšak mohou hrát důležitou roli v jejich funkci.<sup>19</sup>

Většina komerčně dostupných tuků a olejů, ať už rostlinného (kukuřice, olivy, palmy, slunečnice a další rostliny) či živočišného (lůj, sádlo, máslo) původu se téměř výlučně skládá z TGs.<sup>13</sup> Obecně lze říci, že rostlinné oleje jsou bohatší na nenasycené zbytky FAs oproti živočišným tukům, čemuž nasvědčuje i nižší bod tání.<sup>15</sup>



## 2.2 Hmotnostní spektrometrie lipidů

Ačkoli je lipidomika stále více se rozvíjející obor, přetrvává řada problémů, které je třeba řešit. Pro analýzu různých tříd lipidů se nejlépe osvědčily chromatografické techniky jako tenkovrstvá chromatografie (TLC), plynová chromatografie (GC) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) ve spojení s různými způsoby detekce.<sup>20</sup> Další používanou metodou pro zkoumání lipidů je nukleární magnetická rezonance (NMR), ale vzhledem k její relativně malé citlivosti se používá jen výjimečně.<sup>2</sup>

Hmotnostní spektrometrie zaujímá přední místo při charakterizaci lipidů již několik desítek let.<sup>21, 22</sup> Lipidy zahrnují velice rozmanitou škálu nejrozumnějších sloučenin s malými až středními molekulovými hmotnostmi. V počátcích používání hmotnostní spektrometrie bylo její využití omezené z důvodu malé těkavosti nebo tepelné nestability některých tříd lipidů. Proto byla vyvinuta řada metod převádějící tyto látky na těkavé deriváty. S příchodem novějších ionizačních technik jako ionizace elektrosprejem (ESI) a laserové ionizace/desorpce za spoluúčasti matrice (MALDI) bylo umožněno analyzovat tyto molekuly bez předchozí derivatizace.<sup>4, 21</sup> Spojením s chromatografickými technikami a používáním přístrojů umožňující tandemovou hmotnostní spektrometrii (MS/MS) byla nalezena cesta jak analyzovat komplexní směsi lipidů.<sup>3, 8</sup> S ionizačními technikami za atmosférického tlaku je dosaženo vysoké citlivosti s možností provádět kvantitativní analýzy.<sup>5</sup>

Značným problémem je nedostatek komerčně dostupných standardů a izotopově značených vnitřních standardů. Z tohoto důvodu se při kvantifikaci lipidových tříd v biologických vzorcích musí přistoupit ke kompromisu. Interní standardy, kterými jsou v tomto případě směsi neendogenních molekul, normalizují hladiny lipidů jak pro účinnost extrakce, tak pro jejich odezvu při detekci. V dnešní době existují on-line databáze obsahující více než 20 000 lipidových struktur. Tyto databáze však vycházejí z počítačových kombinací prováděných in silico. Mnoho těchto látek se pak v biologických vzorcích vyskytuje ve velmi malých koncentracích, často i pod limit detekce přístroje.<sup>23</sup>

Úlohou hmotnostní spektrometrie je generování iontů z anorganických nebo organických sloučenin, separace těchto iontů podle poměru hmotnosti ku náboji ( $m/z$ ) a kvalitativní i kvantitativní detekce podle jejich příslušnému  $m/z$ . Přístroj se skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru, který pracuje v oblasti vysokého vakua.<sup>24</sup>

Ionizace lipidů je proveditelná řadou ionizačních technik. V rámci této práce jsou studovány TGs, které lze ionizovat různými technikami.

Ionizační techniky pro analýzu TGs používané v minulosti:<sup>25, 26</sup>

- ionizace urychlenými atomy (FAB)
- ionizace polem (FD)
- ionizace termosprejem (TSP)
- desorpční chemická ionizace (DCI)

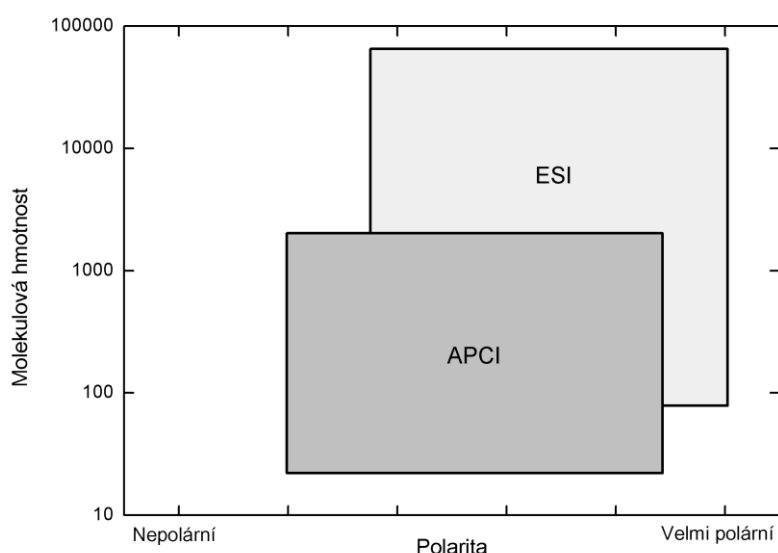
Ionizační techniky pro analýzu TGs používané v dnešní době:<sup>3, 25</sup>

- elektronová (EI) a chemická ionizace (CI)
- elektrosprejová ionizace (ESI)
- chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)
- fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)
- laserová ionizace/desorpce za spoluúčasti matrice (MALDI)

V současnosti jsou APCI a ESI jedny z nejpobulárnějších a nepoužívanějších ionizací za atmosférického tlaku.<sup>27</sup>

### 2.2.1 Chemická ionizace za atmosférického tlaku

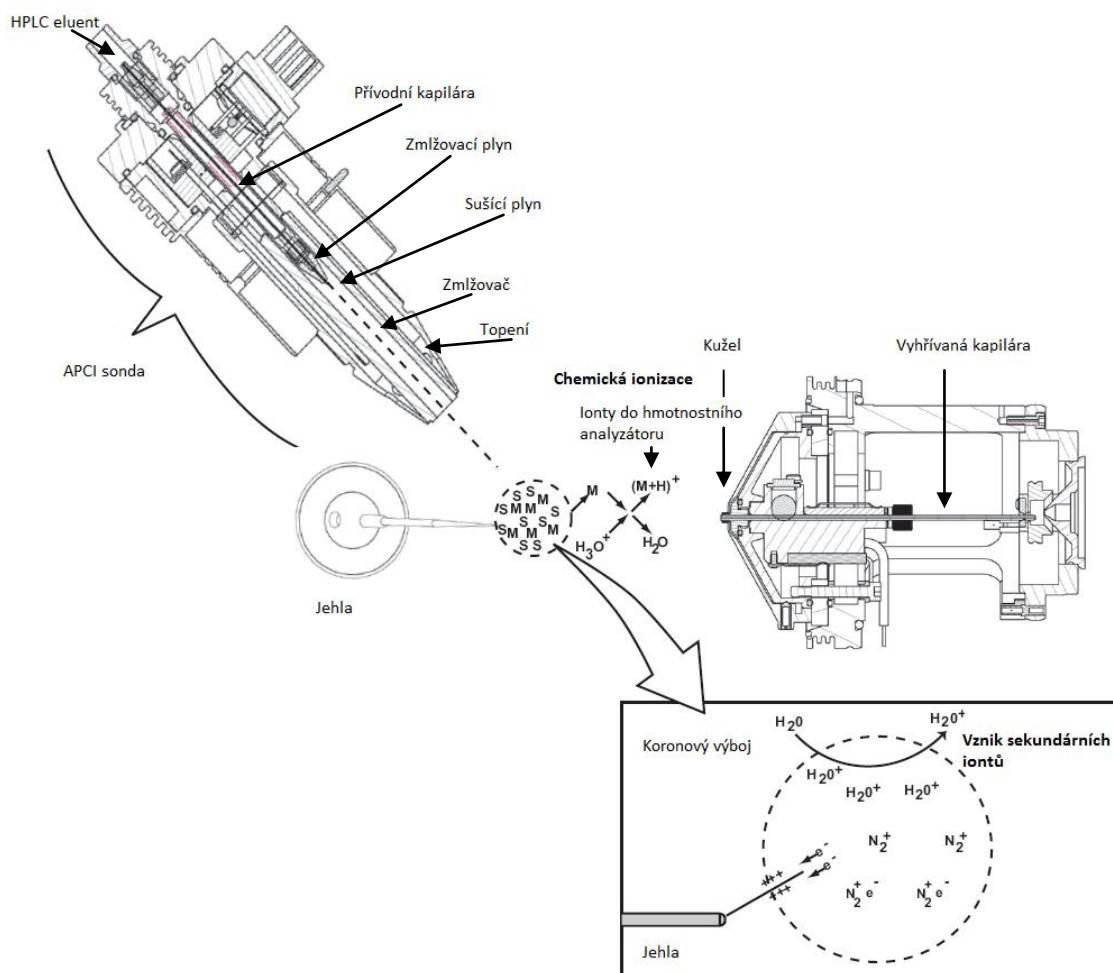
APCI se řadí k důležitým nástrojům pro analýzu lipidů různých tříd. Patří mezi měkké ionizační techniky a oproti ESI poskytuje již určitý stupeň fragmentace v MS spektrech.<sup>28</sup> Výhodou APCI oproti ESI je, že tato technika i ve spojení s kapalinovou chromatografií dává možnost analyzovat analyty o nižší polaritě, které mají poměrně malou molekulovou hmotnost a těkavost (Obr. 2.2).<sup>27, 29, 30</sup>



Obr. 2.2 Analyty, které je možno ionizovat pomocí ESI a APCI. (upraveno podle <sup>27</sup>)

Ionizační zdroj pro APCI se skládá z přírodní kapiláry, kterou je vzorek s mobilní fází, popř. eluát sprejován přes trysku do pneumatického vyhříváného zmlžovače. Ionizace molekul mobilní fáze, která je v nadbytku oproti analytu, probíhá za přítomnosti dusíku jako zmlžovacího plynu. Vzniklý aerosol postupuje přes vyhříváný pneumatický zmlžovač, kde dochází k jeho rozprášení. Pomocný plyn napomáhá k desolvataci aerosolu, který se rychle odpařuje v odpařovači, jehož teplota se nejčastěji pohybuje v rozmezí 300 – 500 °C.<sup>29</sup> Desolvatované molekuly aerosolu následně putují ke špičce jehly, která je umístěna v blízkosti konce trysky. Díky vysokému napětí vloženému na jehlu (jednotky kV) dochází ke koronovému výboji, který způsobuje chemickou ionizaci za atmosférického tlaku. Ion-molekulárními reakcemi vznikají sekundární reakční ionty, které ionizují molekuly analytu.<sup>27, 28</sup> Tyto ionty následně vstupují přes vyhřívanou kapiláru do hmotnostního analyzátoru. V případě APCI zdroje používaném v této práci je tryska umístěna pod úhlem 60 ° od vyhřívané kapiláry, zajišťující přenos iontů do hmotnostního

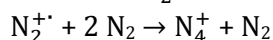
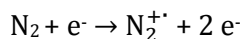
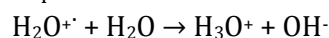
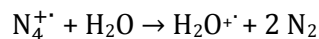
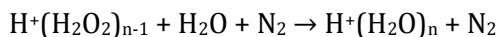
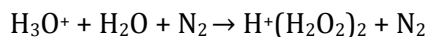
analyzátoru a detektoru. Toto geometrické uspořádání zamezuje vstupu nečistot do kapiláry. Kužel umístěný na vstupu iontů do vyhřívané kapiláry zabráňuje vstupu velkých kapek a částic do kapiláry.<sup>30</sup> Schéma APCI je znázorněno na Obr. 2.3.



Obr. 2.3 Schéma ionizace v APCI v pozitivním módu polarity za použití dusíku jako zmlžovacího plynu (APCI zdroj Thermo Fisher Scientific). (převzato z <sup>30</sup>, upraveno)

### 2.2.1.1 Reakce probíhající během chemické ionizace za atmosférického tlaku

Při atmosférickém tlaku a za přítomnosti dusíku probíhá v plynné fázi řada ion-molekulárních reakcí. Mobilní fáze používané ve spojení s APCI často obsahují vodu. V přítomnosti jejího stopového množství jsou tvořeny protonované klustry vody, které jsou nejběžnějšími sekundárními ionty pozorovanými při APCI. Při teplotě 200 °C se nejčastěji vyskytují ionty  $(H_2O)_2H^+$  s  $(H_2O)_3H^+$  a  $H_3O^+$ .<sup>28</sup> Ion-molekulární reakce probíhající v APCI jsou znázorněny na Obr. 2.4., str. 16. Při použití jiných rozpouštědel, jako např. acetonitril probíhají ion-molekulární reakce analogicky.

*Tvorba primárních iontů ze zmlžovacího plynu**Tvorba reakčních iontů ze složek mobilní fáze**Ionizace analytu*Obr. 2.4 Ion-molekulární reakce při APCI. (převzato z <sup>28, 30</sup>)

Molekuly analytu budou v pozitivním módu polarity protonizovány, pokud protonová afinita analytu převyšuje afinitu reakčního plynu. V negativním módu polarity bude docházet k deprotonaci analytu, pokud je acidita reakčního plynu vyšší než analytu.<sup>29</sup> Pro většinu molekul pozitivní mód produkuje vyšší iontový proud. Obecně se produkuje více pozitivních iontů než negativních. Negativní mód vytváří méně šumových iontů než pozitivní.<sup>30</sup>

Acetonitril zaváděný do APCI poskytuje řadu iontů, které jsou využívány k objasnění struktury některých lipidů. Dříve, než bylo dosaženo využití APCI-MS/MS v kombinaci s acetonitrilem, bylo toto rozpouštědlo používáno zejména v GC/MS. Acetonitril zde slouží jako reakční plyn v iontové pasti při určení molekulové hmotnosti uhlovodíků pomocí CI-MS na základě tvorby tepelně stálých aduktů  $[\text{M} + \text{C}_2\text{H}_2\text{N}]^+$ .<sup>31</sup> Bylo zjištěno, že mononenasyčené uhlovodíky poskytují rovněž molekulární adukt  $[\text{C}_3\text{H}_4\text{N}]^+ ([\text{M} + 54]^+)$ , podle kterého lze určit pozici dvojné vazby.<sup>32</sup> Štěpením dvojné vazby mononenasyčeného uhlovodíku dochází k vytvoření dvou produktů, na které je vázán  $[\text{C}_3\text{H}_4\text{N}]^+$ .<sup>31</sup> Ion-molekulární reakce mezi  $[\text{M} + \text{C}_2\text{H}_2\text{N}]^+$  ( $m/z$  40) a acetonitrilem poskytuje intermediát  $[\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2]^+$  ( $m/z$  81), který ztrácí HCN a tvoří se  $[\text{C}_3\text{H}_4\text{N}]^+$  ( $m/z$  54). Ion byl identifikován jako MIE ((1-methyleimino)-1-ethylion,  $\text{H}_2\text{C}=\text{N}^+=\text{C}=\text{H}_2$ ).<sup>33, 34</sup> Těto metody bylo využito při studiu dvojných vazeb methylesterů mastných kyselin (FAMES).<sup>35</sup>

Pokud je do APCI zaváděn acetonitril vzniká radikalkation  $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}^+$  ( $m/z$  55), jehož struktura není dosud známa. Studium hmotnostních spekter voskových esterů a FAMES ukázalo vznik  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , ale také přítomnost aduktu  $[\text{M} + \text{C}_3\text{H}_5\text{N}]^+$ . Pokud je  $[\text{M} + \text{C}_3\text{H}_5\text{N}]^+$  v iontové pasti podroben fragmentaci, lze z fragmentů určit polohu dvojné vazby. Fragmenty vznikají štěpením vazby C-C v těsné blízkosti dvojné vazby. Spojení této metody s HPLC umožňuje identifikaci dvojných vazeb i v komplexních vzorcích.<sup>9, 36</sup>

**2.2.2 Sférická iontová past**

Používaným hmotnostním analyzátozem byla v této práci sférická iontová past, která se skládá ze vstupní a výstupní elektrody hyperbolického tvaru a středové prstencové elektrody. Na prstencovou elektrodu je vkládáno vysokofrekvenční napětí o měnící se amplitudě a krajní elektrody jsou elektricky spojeny. Díky tomu je vytvořena trajektorie stabilní pro ionty o určité hodnotě nebo rozmezí  $m/z$ , zatímco nežádoucí ionty jsou vypuzeny z iontové pasti. Vybrané ionty jsou následně dle rostoucího  $m/z$  vypuzeny na detektor, což je umožněno díky zvyšující se amplitudě střídavého napětí na prstencové elektrodě.<sup>24, 37</sup> Výhodou iontové pasti je, že patří k analyzátorům umožňující tandemovou časovou analýzu, která zahrnuje několik kroků: selekci prekurzorového iontu, aktivaci

iontu a fragmentaci iontu. Fragmentace iontů je prováděna kolizně indukovanou disociací (CID). Během této disociace dochází ke změně amplitudy vysokofrekvenčního napětí a ionty zachycené v pasti jsou urychleny a dostávají tak vysokou kinetickou energii. Srážkami s kolizním plynem (helium) dochází k fragmentaci iontu. Během kolize může být část kinetické energie přeměněna na vnitřní energii, čímž dochází k rozbití vazby.<sup>24</sup> Společnost Thermo Fisher Scientific vyvinula další typ aktivace iontů a to pulzní Q kolizní indukovanou disociaci (PQD), díky které lze pozorovat fragmenty v nižších oblastech  $m/z$ . Oproti CID je ion držen v oblasti vysoké energie jen velice krátkou dobu. Následuje rychlá změna amplitudy vysokofrekvenčního napětí na nižší hodnotu a fragmentace probíhá při této nízké hodnotě. Kombinací vysoké a nízké hodnoty amplitudy vysokofrekvenčního napětí je umožněno pozorovat fragmenty již od hodnoty  $m/z$  50.<sup>38</sup>

## 2.2.3 Chromatografické techniky ve spojení s hmotnostní spektrometrií

### 2.2.3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí

Separaci lipidových tříd lze provést pomocí adsorpční chromatografie nebo chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC). Mobilními fázemi využívanými v HILIC jsou normální fáze mísitelné s vodou, které obsahují vysoké procento organické složky (typicky > 80 %).<sup>23</sup> Oba systémy umožňují separaci na základě různé polaritativy lipidů jednotlivých tříd. Používají se silikagelové nebo diolové kolony.<sup>39, 40</sup>

Nejpoužívanější technikou pro analýzu TGs je vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC), která poskytuje separaci podle délky uhlovodíkového řetězce a stupně nenasycenosti acylů. Obecně TGs eluují ve vzestupném pořadí ekvivalentního počtu uhlíkových atomů (ECN). Každá dvojná vazba snižuje retenci molekul, což vyjadřuje vztah

$$ECN = CN - 2DB \quad (2.1)$$

kde CN je celkový počet uhlíků a DB je počet dvojných vazeb.<sup>6, 41</sup>

Vysokou selektivitu pro TGs poskytuje oktadecylsilanová stacionární fáze. Délka analytických kolon se nejčastěji pohybuje od 250 do 300 mm s vnitřními průměry 4 – 5 mm.<sup>42</sup> Velice časté je i sériové zapojení kolon.<sup>39</sup> Nejen kolona, ale také výběr mobilní fáze hraje velice důležitou roli při rozdělení TGs. Separace TGs s odlišnou délkou uhlovodíkového řetězce vyžaduje gradientovou eluci. Mezi vhodné mobilní fáze patří aceton, propan-2-ol, methyl butylether nebo dichlormethan s acetonitrilem. Rostoucí teplota v koloně snižuje retenční čas, ale zároveň poskytuje horší separaci. Problémem mohou být nasycené TGs, které se v mobilní fázi nemusí zcela rozpouštět.<sup>42</sup>

Při argentacní vysokoúčinné kapalinové chromatografii (Ag-HPLC) jsou stříbrné ionty ukotveny v kationtově-výměnné či silikagelové koloně. Základem této techniky je schopnost  $\pi$ -elektronů dvojných vazeb TGs interagovat s ionty stříbra a tvořit stabilní polární komplexy. Separace probíhá podle stupně nenasycenosti a rovněž je důležitá pozice i konfigurace dvojných vazeb v rámci každého zbytku FA.<sup>6, 42</sup> Mezi používané mobilní fáze u Ag-HPLC patří směs hexan-acetonitril s propan-2-olem jako modifikátorem. Tím je dosaženo vysokých rozlišení a separace pozičních izomerů obsahujících dlouhé řetězce polynenasycených FAs.<sup>43</sup>

Superkritická fluidní chromatografie (SFC) je další z chromatografických technik, kterou lze použít pro separaci molekulárních druhů TGs.<sup>21, 44</sup> Spojuje výhody GC a HPLC.

Eluentem je plyn, který se používá při vyšším tlaku a teplotě, než jsou jeho kritické hodnoty. Nad tímto bodem se stírají rozdíly mezi plynem a kapalinou a substance dostává název superkritická kapalina. Jako mobilní fáze se v tomto případě používá oxid uhličitý (kritická teplota 31,1 °C, kritický tlak 72,9 atm). Výhodou oproti HPLC je nižší tlak během analýzy, netoxičnost mobilní fáze a její finanční dostupnost v požadované čistotě. Komerční stacionární fáze jsou dostupné v odlišné polaritě (např. dimethylpolysiloxan, methylfenylpolysiloxan, difenylpolysiloxan nebo kyanopolysiloxan). Kolona je umístěna ve vyhřívaném termostatu, kdy teplota je nastavena nad kritickou teplotu mobilní fáze. Pro větší rozlišení může být použit sestupný teplotní program nebo vzestupný tlakový program analýzy.<sup>42</sup>

### 2.2.3.2 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Separace TGs pomocí GC není příliš vhodná. Výhodnější technikou je vysokoteplotní plynová chromatografie (HT-GC). Rozdělení probíhá na nepolárních stacionárních fázích a molekuly jsou separovány dle rostoucího počtu uhlíkových atomů.<sup>6, 42, 45</sup> Použitím kapilárních kolon s polární stacionární fází a teplotou do 370 °C je dosaženo separace acylglycerolů podle počtu dvojných vazeb a uhlíkových atomů.<sup>45, 46</sup>

Kapilární GC je vhodná pro studium FAMES. Polarita stacionární fáze ovlivňuje retenční časy zejména polynenasycených FAMES. V polárních fázích při konstantní délce uhlovodíkového řetězce každá dvojná vazba zvyšuje retenční čas molekuly. Je možné oddělit izomerní molekuly lišící se polohou dvojných vazeb.<sup>47</sup> Často používanou vysoce polární fází je např. 100% kyanopropylsilikonová stacionární fáze s označením CP-Sill 88<sup>TM</sup>.<sup>48</sup> Nevýhodou vysoce polárních fází je menší životnost oproti nepolárním stacionárním fázím a nižší teplotní stabilita.<sup>47</sup> Další používanou stacionární fází je nepolární, která je tvořena např. 95% dimethyl-5% difenylpolysiloxanem s označením DB-5.<sup>49</sup> Použitím nepolárních kolon eluují FAMES dle své teploty varu, tedy nenasycené molekuly eluují před nasycenými molekulami. Na této koloně lze rovněž oddělit izomerní molekuly lišící se polohou dvojných vazeb. Hlavní nevýhodou tohoto typu stacionární fáze je částečné překrývání nenasycených FAMES.<sup>47</sup> Její nespornou výhodou je chemická inertnost a vysoká teplotní stabilita, díky čemuž se dají využít při separaci látek s vysokou molekulovou hmotností.<sup>46</sup> Kolona se středně polární stacionární fází kombinuje výhody velmi polární a nepolární stacionární fáze. Má tedy relativně vysokou teplotní stabilitu a vysokou dělicí schopnost.<sup>47</sup> Jedna z nejpoužívanějších středně polárních stacionárních fází je složena z polyethylen glykolu s komerčním názvem Carbowax<sup>TM</sup>.<sup>48, 49</sup>

## 2.3 Určování poloh dvojných vazeb u triacylglycerolů

Většina metod pro lokalizaci dvojných vazeb využívá EI, kterou poskytuje GC/MS. Tato metoda však vyžaduje těkavé a tepelně stabilní lipidy nebo jejich deriváty. Proto musí být lipidy, které tyto podmínky nesplňují, podrobeny hydrolýze. Hydrolýza lipidů způsobuje ztrátu informací o FAs vázaných v původních lipidech. Proto se hledají techniky založené na ionizaci za atmosférického tlaku MS spojené s HPLC.<sup>9</sup>

### 2.3.1 Chemická ionizace kovalentních aduktů

Spojení APCI s acetonitrilem jako mobilní fází umožňuje lokalizaci dvojných vazeb u TGs a umístění acylu na glycerolu.<sup>8, 25</sup> Vzniká produkt, podle jehož fragmentů je možné dvojnou vazbu v TGs identifikovat.<sup>8</sup> Kovalentní reakce nenasycených TGs s ionty o  $m/z$  40,  $m/z$  54,  $m/z$  81 a  $m/z$  95 poskytuje molekulární adukty  $[M+40]^+$ ,  $[M+54]^+$ ,  $[M+81]^+$  a  $[M+95]^+$ , které slouží k identifikaci dvojných vazeb u TGs. Podmínkou pro vznik těchto molekulárních aduktů je přítomnost plazmy, ve které aktivní ionty reagují s neutrálními TGs. U monoenoových FAs převažuje allylový typ štěpení (v  $\beta$  pozici vzhledem k dvojně vazbě). Dienové FAs poskytují vinylové štěpení (v  $\alpha$  pozici vzhledem k dvojně vazbě). Z porovnání intenzit  $[M-FA+54]^+$  nebo  $[M-FA+40]^+$  se získají informace o pozici FAs na glycerolovém řetězci.<sup>25</sup>

Zaváděním acetonitrilu do APCI vzniká radikálkation  $C_3H_5N^+$  ( $m/z$  55), z jehož fragmentů lze určit polohu dvojně vazby. Tato metoda byla doposud aplikována pouze na 1-palmitoyl-2,3-dioleoyl-glycerol.<sup>9</sup> Podrobením aduktu  $[M+55]^+$  fragmentaci lze v APCI-MS/MS spektru pozorovat ionty, které odpovídají vinylovému štěpení vazby. Ke štěpení vazby C-C tak dochází v blízkosti dvojně vazby. Oba fragmenty jsou ve spektru přítomny za předpokladu, že je použit přístroj umožňující pozorovat ionty o nižším  $m/z$ . Porovnáním s metodou využívající vznik molekulárního aduktu  $[M+54]^+$  tato metoda vykazuje mnohem vyšší intenzitu diagnostických iontů, tudíž i interpretace spekter je přesnější.<sup>9</sup>

### 2.3.2 Vysokoenergetická kolizně indukovaná disociace

Kompletní strukturní charakterizaci TGs lze provést pomocí vysokoenergetické CID. Detailní popis molekul je možný díky „charge-remote“ fragmentacím (CRFs) aduktů zejména se sodnými ionty tvořených pomocí FAB a analyzovaných čtyř-sektorovým hmotnostním analyzátozem. Kontinuální dávkování vzorku TGs do iontového zdroje je realizováno pumpou.<sup>50</sup> Tento typ fragmentace se používá pro studium struktur s dlouhým řetězcem a vede ke ztrátě  $C_2H_{2+1}$  a  $C_nH_{2n+2}$  z prekurzorového iontu.<sup>50, 51</sup> Interpretace FAB-MS spekter aduktů  $[M+Na]^+$  poskytuje informace o molekulové hmotnosti, počtu uhlíků, stupni nenasycenosti každé acylové skupiny, pozici dvojně vazby na acylovém konci a pozici acylu na glycerolovém řetězci. Spektra však nedávají informace o pozici acylových zbytků na glycerolovém řetězci.<sup>50</sup>

Technikou umožňující strukturální analýzu TGs je také laserová ionizace/desorpce za spoluúčasti matrice s tandemovým uspořádáním analyzátoru doby letu (MALDI-TOF/TOF). Sodné adukty TGs jsou podrobeny monoizotopickému výběru prekurzoru. Selektce iontu je umožněna pomocí TOF, kdy dlouhá doba letu iontů umožňuje dostatečnou separaci. Kombinací s vysokoenergetickou CID je zajištěna strukturní

charakterizace TGs i v komplexních vzorcích bez předchozí chromatografické separace. U nenasyčených vazeb jsou intenzity CRF píků relativně nízké nebo zcela chybí.<sup>52</sup>

### 2.3.3 Nízkoenergetická kolizně indukovaná disociace

Další metodou pro lokalizaci dvojných vazeb je tandemová hmotnostní spektrometrie lithiových aduktů s nízkoenergetickou CID. Použití ESI a trojitého-kvadrupólu poskytuje strukturální informace o TGs. Z fragmentačních spekter lze získat informace o pozici dané FA na glycerolovém řetězci. Ionty ve fragmentačním spektru  $[M+Li-(RCO_2H)]^+$  a  $[M+Li-(RCO_2Li)]^+$  odpovídají molekulové hmotnosti každé FA. Jejich polohu na glycerolovém řetězci lze určit z intenzit fragmentů ve spektru. Pozice dvojně vazby u TG se určuje pomocí dilithiových aduktů  $[RCO_2Li_2]^+$ .<sup>26</sup>

### 2.3.4 Ozonově indukovaná disociace

Ozonově indukovaná disociace (OzID) a konvenční CID poskytuje informace o pozici dvojně vazby ve složených lipidech. Nejprve dochází v ESI k tvorbě molekulárních aduktů  $[M+Na]^+$ . Do iontové pasti je zaváděn ozón, který poskytuje s molekulárním aduktem primární ozonid. Jeho fragmentací vznikají dva produkty, které se dále fragmentují. Podle těchto produktů lze lokalizovat dvojnou vazbu v TGs. Tato metoda byla aplikovaná pouze na TGs, jež mají jen jednu dvojnou vazbu ve svém acylu.<sup>53</sup>

## 2.4 Novorozenecký mázek

Novorozenecký mázek (vernix caseosa, VC) je bílá sýrovitá hmota pokrývající pokožku novorozenců a plodu v posledních stádiích těhotenství. Vyskytuje se pouze u lidí. Tento biofilm plní řadu funkcí před porodem, během porodu i v několika následujících dnech po narození dítěte. Začíná se tvořit v třetím trimestru těhotenství a je produkován mazovými žlázami plodu.<sup>54</sup> Jedním z hlavních úkolů VC je ochrana pokožky čerstvě narozených dětí a snadnější adaptace na prostředí mimo dělohu matky.<sup>55, 56</sup> Označení „vernix caseosa“ bylo pro VC poprvé použito již roku 1846 v „Dunglison dictionary of Medical Science“.<sup>55</sup>

### 2.4.1 Složení novorozeneckého mázku

VC je multisložková směs skládající se ze tří hlavních komponent, a to z vody (80 %), proteinů (10 %) a lipidů (10 %).<sup>57, 58</sup> Dále obsahuje odumřelé kožní buňky, které patří mezi největší rezervoár vody ve VC.<sup>59, 60</sup>

#### 2.4.1.1 Lipidy

První kvantitativní analýza lipidů ve VC byla provedena v 30. letech 20. století.<sup>61</sup> VC obsahuje velice širokou škálu různých lipidových tříd.<sup>62</sup> Z nejsvrchnější vrstvy pokožky (*stratum corneum*) se odvozují tzv. bariérové lipidy, které jsou tvořeny cholesterolem, volnými FAs, fosfolipidy a ceramidy.<sup>63</sup> Nepolární lipidy jako sterol estery, voskové estery a TGs pocházejí z mazových žláz kůže plodu.<sup>64</sup> V Tab. 2.1 je uvedeno procentuální zastoupení jednotlivých lipidů přítomných ve VC.



Tab. 2.1 Zastoupení jednotlivých složek lipidů ve VC<sup>59</sup>

Výskyt lipidů	Třída lipidů	(w/w) %
Lipidy z mazových žláz kůže plodu	Sterol estery a voskové estery	42,0
	Triacylglyceroly	35,9
	Skvalen	6,4
Lipidy ze stratum corneum	Ceramidy	4,9
	Volné mastné kyseliny	1,5
	Cholesterol	3,5

Během prvních analýz prováděných v 60. letech 20. století bylo zjištěno, že ve VC se vyskytují TGs jak s nenasycenými acylovými řetězci, tak i s nasycenými.<sup>64</sup> Další výzkumy ukázaly, že v TGs se též vyskytují FAs s kratším uhlovodíkovým řetězcem.<sup>59</sup> Doposud bylo ve VC identifikováno 133 FA. Z nich je 46 % nasycených nerozvětvených a 29 % nasycených rozvětvených. Dalších 22 % z celkového množství zaujímají mononenasycené, 2,3 % dinenasycené a 0,2 % trinenasycené FAs.<sup>61</sup> Jejich uhlovodíkové řetězce obsahují od 14 do 32 uhlíků.<sup>59</sup> Nejvyšší intenzitou se vyznačují větvené FAs jako i14:0, 4, 11-diMe-14:0 a 15:0. Označení iFAs je použito pro iso-methyl rozvětvené FAs, které mají methyl navázaný na předposledním uhlíku uhlovodíkového řetězce a aFAs odpovídá anteiso-methyl rozvětveným FAs, jež mají methyl umístěný dva uhlíky od konce uhlovodíkového řetězce.<sup>65</sup>

#### 2.4.1.2 Proteiny

Složení proteinové složky VC nebylo ještě zcela prostudováno.<sup>66</sup> Doposud je známo, že nejhojněji zastoupeným proteinem ve VC je keratin pocházející z kožních buněk.<sup>59, 60</sup> Proteiny VC se podílí na vrozené imunitě dítěte. Antimikrobiální aktivitou se vyznačují další látky proteinové povahy jako lysozym, laktoferin, cystatin A, calgranulin a ubiquitin.<sup>67, 68</sup> Analýza volných aminokyselin ukázala, že mezi nejhojněji jsou zastoupené asparagin, glutamin a histidin.<sup>69, 70</sup>

#### 2.4.2 Biologická funkce novorozeneckého mázku

Dosud není zcela objasněno a vysvětleno jaké úkoly VC plní, také kvůli nedostatečné znalosti jeho chemického složení. Před narozením dítěte poskytuje VC epidermální hydrofobní bariéru působící proti maceraci v plodové vodě a rovněž napomáhá k odpojení plicního surfaktantu.<sup>71, 72</sup> Následně během porodu chrání dítě před bakteriemi osidlujícími matčinu genitální oblast a rovněž slouží jako lubrikant. Díky vysokému obsahu vody podporuje hydrataci pokožky dítěte.<sup>59, 61</sup> Zachování stále teploty povrchu těla novorozenců je velice důležité hlavně u předčasně narozených dětí. Avšak nebylo dosud zcela ještě prokázáno, zdali právě ponechání mázku na jejich pokožce nejvíce přispívá k zachování teploty těla. Díky velice rychlé změně prostředí, které dítě prodělá během porodu, dochází i ke snížení hydratace pokožky.<sup>72</sup> VC tak zabraňuje rychlému vysychání povrchu těla novorozence.<sup>61</sup> Po porodu je pokožka novorozence vystavena výraznému zvýšení hladiny kyslíku a plod je již v děloze vystaven volným kyslíkovým radikálům. Zatím však není zcela jasné, zdali antioxidant vitamín E, který je obsažen ve VC, přispívá ke zvládnutí oxidačního stresu.<sup>69</sup> Dále obsahuje antimikrobiální peptidy sloužící jako ochrana proti některým bakteriím.<sup>73</sup> Antimikrobiální aktivitou se rovněž vyznačují volné FAs obsažené ve VC.<sup>67</sup>

### 2.4.3 Diagnostická funkce novorozeneckého mázku a jeho možné využití

Lokalizace a množství VC vypovídá o donošenosti dítěte. VC se může na povrchu dítěte vyskytovat pouze v rýhách a záhybech novorozence, což naznačuje řádně donošené dítě. Jestliže se nachází na většině povrchu těla, lze usuzovat na předčasně narozené dítě. Pokud se jeví VC jako nazelenalý, je zřejmé, že mekonium (smolka, obsah střev plodu) vyšlo ještě před porodem, což nasvědčuje tomu, že se jedná o přenošené dítě anebo nefunguje dostatečně placenta.<sup>74</sup> Děložní ruptura je jednou z nejzávažnějších komplikací při vaginálním porodu, kterému předcházela porod císařským řezem. Další poporodní komplikací je vernixurie, neboli nález VC v moči matky.<sup>61, 75</sup> Vzácnými komplikacemi císařského řezu jsou zánět pobřišnice (vernix caseosa peritonitis) nebo granulomatózní zánět (vernix caseosa granuloma), které jsou způsobeny velkým množstvím VC na povrchu pokožky dítěte a následným nedostatečným vyčistěním břišní dutiny.<sup>55, 76, 77</sup> Pokud prenatální ultrasonografie zjistí velké množství VC na těle plodu, nevylučuje se možnost výskytu novorozeneckého aspiračního syndromu a granulomatózní meningitidy (vernicomylia).<sup>78, 79</sup>

Analogy VC mohou být využívány v kosmetickém průmyslu, jelikož bylo prokázáno, že exogenně nanesený VC dokáže kůži očistit od nečistot.<sup>55, 68</sup> Lipidové složení VC přispívá k lepší hydrataci stratum corneum a navrhuje se, že může sloužit k obnovení kožní bariéry u předčasně narozených dětí. Díky jedinečným vlastnostem VC byly již pokusy tuto jedinečnou hmotu vyrábět synteticky. Doposud bylo cílem syntetizovat směs, která by měla podobné lipidové složení, organizaci a tepelně-izolační vlastnosti jako VC. Problémem je, že nepolární nasycené rozvětvené sterol estery, voskové estery a diestery diolů nejsou komerčně dostupné. Je však známé, že lanolín pocházející z ovčí vlny obsahuje lipidy, které jsou rovněž obsaženy ve VC. Proto byl také vybrán jako hlavní zdroj rozvětvených sterol esterů a voskových esterů. Nejvýznamnější roli v napodobení tepelně-izolačního chování hrají nenasycené TGs.<sup>62</sup> Dalším přiblížením ke skutečnému VC bylo do již připravené semi-syntetické směsi lanolinu s dalšími lipidy, zakotvení hexagonálního vysoce hydratovaného a rozvětveného polyglycerolu (mikrogelové částice). Toto uspořádání napomáhá k udržování obsahu vody v připravené semi-syntetické směsi.<sup>60</sup>

## 3 Experimentální část

### 3.1 Použité chemikálie

4', 5'- Dichlorfluorescein	Fluka Chemie AG (Buchs, Švýcarsko)
Deionizovaná voda	Milli Q, Millipore (Milford, MA, USA)
Diethylether	p.a., destilovaný, Penta (Chrudim, ČR)
Dusičnan stříbrný	≥99,5 %, Penta (Chrudim, ČR)
Hexan	p.a., destilovaný, Penta (Chrudim, ČR)
Hexan	≥95%, Chromasolv® pro HPLC, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Chloroform	p.a., stabilizovaný 1 % methanolu, Penta (Chrudim, ČR)
Kyselina sírová	96%, Lach-Ner (Neratovice, ČR)
Methanolát sodný	≥ 97,0%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Rhodamin 6G	≥ 97,0%, Merck (Darmstadt, Německo)
Síran hořečnatý	>98%, Lach-Ner (Neratovice, ČR)
4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (vanilin)	≥98%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Acetonitril	≥99,9%, Chromasolv® pro LC-MS, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Methanol	≥99,9%, Chromasolv® pro HPLC, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Propan-2-ol	≥99,9%, Chromasolv® pro LC-MS, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
1,2,3-Tri( <i>cis</i> -10-undecenoyl)glycerol (triundecenoin)	>99%, Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)
1,2,3-Tri( <i>cis</i> -11-oktadecenoyl)glycerol (trivacenin)	>99%, Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)
1,2,3-Tri( <i>cis</i> -6-oktadecenoyl)glycerol (tripetroselinin)	>99%, Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)
1,2,3-Tri( <i>cis</i> -9, 12-oktadecenoyl)glycerol (trilinolein)	>99%, Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)
1,2,3-tri( <i>cis</i> -9-oktadecenoyl)glycerol (tripalmitolein)	>99%, Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)
1,2,3-Tri( <i>cis</i> -9-oktadecenoyl)glycerol (triolein)	>99%, Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)
1,2,3-Tri( <i>trans</i> -6-oktadecenoyl)glycerol (tripetroselaidin)	>99%, Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)
1,2,3-Tri( <i>trans</i> -9, 12-oktadecenoyl)glycerol (trilinoelaidin)	>99%, Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)
1,2,3-Tri( <i>trans</i> -9-oktadecenoyl)glycerol (trielaidin)	>99%, Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)

1,2,3-Tri(*cis*-6, 9, 12-oktadecenoyl)glycerol >99%, Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)  
(trigama linolenin)  
1,2,3-Tri(*cis*-4, 7, 10, 13, 16, 19-dokosanoyl)- >99%, Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)  
glycerol (tridokosaheptaenoin)  
1,2,3-Tri(*cis*-5, 8, 11, 14, -ikosanoyl)- >99%, Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)  
glycerol (triarachidonin)  
1,2,3-Tri(*cis*-9, 12, 15-oktadecenoyl)glycerol >99%, Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)  
(trialfa linolenin)  
1,2,3-Tri(*cis*-5, 8, 11, 14, 17-ikosanoyl)- >99%, Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)  
glycerol (triekosapentaenoin)

### 3.2 Použitý materiál

Přečištěná vata	Soxhletova extrakce 10 hodin směsí chloroform:methanol (1:1, v/v)
Molekulové síto	velikost pórů 4Å, peletky 3,2 mm (Sigma- Aldrich, USA)
Silikagel pro filtraci	velikost částic: 30 – 60 µm
Silikagel pro TLC	silikagel 60G, Merck (Darmstadt, Německo)
Bezvodý síran hořečnatý	vyžíhaný 12 hodin při 140 °C

### 3.3 Použité biologické vzorky

Olivový olej	nerafinovaný (extra panenský, Frantoio Larocca)
Rybízový olej	frakce TGs získaná semipreparativní TLC <sup>80</sup>
Novorozenecový mázek	frakce TGs získaná semipreparativní TLC (vzorek VC byl odebrán z pokožky zdravého dítěte a následnou extrakcí provedenou Mgr. Radkou Míkovou, byly získány TGs)

### 3.4 Přístroje a zařízení

Analytické váhy Mettler-Toledo AB204-S	(Greifensee, Švýcarsko)
Automatický dávkovač Agilent 7683 B	(Agilent Technologies, USA)
Hmotnostní detektor Agilent 5975B MSD	(Agilent Technologies, USA)
Hmotnostní spektrometr LCQ Fleet	(Thermo Fischer Scientific, USA)
Plynový chromatograf Agilent 6890N	(Agilent Technologies, USA)
Kolona Nova-Pak® C <sub>18</sub>	(Waters, USA)
Předkolona	(Phenomenex, USA)
Kapilární kolona JW Scientific DB-5ms	(Agilent Technologies, USA)

## 3.5 Pracovní postupy

### 3.5.1 Argentační tenkovrstvá chromatografie

Díky komplexnosti vzorku extraktu TGs z VC předcházela separaci pomocí HPLC ještě separace na argentační tenkovrstvé chromatografii (Ag-TLC), čímž se dosáhlo oddělení nasycených TGs od nenasycených. Na preparativní Ag-TLC byla zřetelná skvrna charakterizující nasycené TGs,  $R_F = 0,9$ . Zbylé skvrny náležící nenasyceným TGs o  $R_F = 0,4 - 0,8$  byly dále zpracovány. Vzorek takto získaných TGs (1,8 mg/ml), byl rozpuštěn v chloroformu.

### 3.5.2 Hmotnostní spektrometrie s přímým zaváděním vzorku

Ke studiu TGs byl používán hmotnostní spektrometr LCQ Fleet se sférickou iontovou pastí. Analýza standardů a nově syntetizovaných TGs byla provedena přímým nástřikem do iontového zdroje APCI. Měření fragmentačních spekter vzorků TGs předcházela optimalizace základního nastavení, jež měla za cíl zvýšení signálu radikalkationtu  $[M+C_3H_5N]^+$  ( $[M+55]^+$ ). Fragmentací tohoto iontu lze v MS/MS spektrech určit polohu dvojné vazby daného TG. V průběhu měření byly optimalizovány následující parametry: teplota zmlžovače, teplota kapiláry, napětí na tubusové čočce i kapiláře a průtoky nosného a zmlžovacího plynu. Konečná nastavení hmotnostního spektrometru LCQ Fleet pro analýzu standardů TGs a randomizačních směsí jsou shrnuta v Tab. 3.1. Pro jednotlivé TGs byla nastavována kolizní energie individuálně v rozsahu 27,5 – 38,0 %. Nastavení šířky izolačního okna se pohybovalo v rozmezí 0,4 - 2,3 Da a délka časového záznamu byla od 1 do 10 minut. K vyhodnocování dat byl použit program Xcalibur, verze 2.0.7 (Thermo Fischer Scientific, USA).

Tab. 3.1 Nastavení hmotnostního spektrometru LCQ Fleet.

Parametr	Hodnota
Teplota zmlžovače [°C]	250
Teplota kapiláry [°C]	180
Napětí na tubusové čočce [V]	120
Napětí na kapiláře [V]	23
Průtok nosného plynu [a.u.]	45
Průtok zmlžovacího plynu [a.u.]	60

### 3.5.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí

K separaci přírodních směsí byly použity dvě kolony Nova-Pak® C<sub>18</sub> zapojené v sérii s předkOLONOU. Základní vlastnosti kolon Nova-Pak® C<sub>18</sub> jsou uvedeny v tabulce Tab. 3.2.

Tab. 3.2 Základní vlastnosti kolon Nova-Pak® C<sub>18</sub>.

Vlastnosti	Kolona č. 1	Kolona č. 2
Vázaná fáze	oktadecyl	oktadecyl
Nosič	silikagel	silikagel
Velikost pórů [Å]	60	60
Délka kolony [cm]	30	15
Vnitřní průměr [mm]	3,9	3,9
Průměr částic [μm]	4	4

#### 3.5.3.1 Rostlinné oleje

Analýzy rostlinných olejů byly prováděny podle práce.<sup>41</sup> Chromatografická kolona byla umístěna v termostatu (30 °C) a před měřením promyta směsí rozpouštědel. Nejprve 15 minut čistým acetonitrilem o průtoku 800 μl/min a poté 5 minut mobilní fází s obsahem acetonitrilu 31 % a propan-2-olu 69 % o stejném průtoku. Posléze byla kolona promývána 15 minut mobilní fází odpovídající složení fáze na začátku analýzy, tj. 100% acetonitril. Mezi analýzami byla kolona promývána stejným způsobem. Složení používané mobilní fáze je uvedeno v Tab. 3.3.

Tab. 3.3 Gradientový program separace rostlinných olejů.

t	acetonitril	propan-2-ol	F <sub>m</sub>
min	%	%	μl/min
0	100	0	800
106	31	69	800
109	100	0	800
130	100	0	800

Vzorek nerafinovaného olivového oleje (10 mg/ml) a rybízového oleje (10 mg/ml) byl rozpuštěn ve směsi acetonitril/propan-2-ol/hexan (1:1:1, v/v/v). Bylo nastříkováno 10 μl vzorku a průtok mobilní fáze byl 800 μl/min. Kolony byly spojeny s hmotnostním spektrometrem LCQ Fleet. Analýza rostlinných olejů byla prováděna v režimu data dependentní fragmentace prekurzorů s dynamickou exkluzí, přičemž nastavení je uvedeno v Tab. 3.4. Při data dependentní fragmentaci prekurzoru hmotnostní spektrometr zaznamenává kromě plného MS skenu i další sken, kdy provádí fragmentaci vybraného prekurzoru.

Tab. 3.4 Nastavení závislého skenu hmotnostního spektrometru LCQ Fleet pro rostlinné oleje.

Parametr	Hodnota
Minimální signál [impulzy]	40
Počet iontů vybraných pro fragmentaci	1
Typ aktivace	CID
Izolační šířka [ $m/z$ ]	2,0
Normalizovaná kolizní energie [%]	34

### 3.5.3.2 Novorozenecký mázek

Separace vzorku TGs pocházejícího z VC <sup>81</sup> probíhala na koloně Nova-Pak® C<sub>18</sub> s předkolonou umístěné v termostatu (30 °C), která byla před vlastním měřením promyta směsí rozpouštědel. Nejprve 15 minut čistým acetonitrilem o průtoku 800 µl/min, poté 5 minut mobilní fází obsahující 34 % acetonitrilu a 66 % propan-2-olu o stejném průtoku. Dalších 10 minut byla kolona promývána průtokem mobilní fáze 550 µl/min, její složení bylo 24 % acetonitril a 76 % propan-2-ol. Posléze byla kolona promývána 15 minut mobilní fází odpovídající složení fáze na začátku analýzy. Mezi analýzami byla kolona promývána stejným způsobem. Složení mobilní fáze shrnuje Tab. 3.5.

Tab. 3.5 Gradientový program separace VC.

t min	acetonitril %	propan-2-ol %	F <sub>m</sub> µl/min
0,0	100	0	800
99,0	34	66	800
114,5	24	76	550
142,0	5	95	300
165,0	5	95	300
170,0	100	0	550
175,0	100	0	800

Pro HPLC byl nástřikový objem vzorku 25 µl a průtok mobilní fáze 800 µl/min. Analýza VC byla prováděna dvěma typy skenu. Nejprve byl vzorek podroben analýze v režimu data dependentní fragmentace prekurzorů. Další analýza probíhala metodou fragmentace zvolených prekurzorů. Přístroj zaznamenával pouze fragmentační spektrum pro 3 vybrané ionty ( $m/z$  817,8,  $m/z$  887,4 a  $m/z$  1027,8). Nastavení hmotnostního spektrometru je uvedené v Tab. 3.6.

Tab. 3.6 Nastavení data dependentní fragmentace prekurzorů (Hodnota č. 1) a fragmentace zvolených prekurzorů (Hodnota č. 2) hmotnostního spektrometru LCQ Fleet.

Vlastnost	Hodnota č. 1	Hodnota č. 2
Minimální signál [impulzy]	40	40
Počet iontů vybraných pro fragmentaci	1	1
Typ aktivace	CID	CID
Izolační šířka [ $m/z$ ]	2,0	1,8
Normalizovaná kolizní energie [%]	33	33

### 3.5.4 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Pro analýzu FAMEs byl použit plynový chromatograf Agilent 6890N spojený s hmotnostním detektorem Agilent 5975B MSD s iontovým zdrojem pro elektronovou ionizaci a kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem. Přístroj byl vybaven kapilární kolonou JW Scientific DB-5ms o délce 30 m, vnitřním průměru 250  $\mu\text{m}$  a tloušťce filmu 0,25  $\mu\text{m}$ . Vzorek byl dávkován pomocí automatického dávkovače Agilent 7683 B. Pro sběr dat a vyhodnocení chromatogramů byl použit program Data Analysis (Agilent Technologies, USA).

Při GC/MS analýzách bylo využito dávkování s děličem toku a dělicí poměr byl 1:10, s dávkovaným objem vzorku 1  $\mu\text{l}$  a teplotou nástřiku 230  $^{\circ}\text{C}$ . Nosným plynem bylo helium. Teplotní program byl nastaven tak, aby počáteční teplota pece byla 60  $^{\circ}\text{C}$ , která byla udržována po dobu 2 minut. Posléze se teplota zvyšovala rychlostí 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  na maximální teplotu 320  $^{\circ}\text{C}$ , která se udržovala 10 minut. Transfer line byla vyhřívána na 280  $^{\circ}\text{C}$ , kvadrupólový hmotnostní analyzátor na teplotu 150  $^{\circ}\text{C}$  a teplota zdroje činila 230  $^{\circ}\text{C}$ . Použitá ionizační energie byla 70 eV a spektra byla snímána v rozsahu 25 – 800  $m/z$ .

### 3.5.5 Randomizace triacylglycerolů v mikroměřítu

Randomizační reakce (interesterifikace) prováděná v mikroměřítu vycházela z publikovaného postupu.<sup>82</sup> Výchozími látkami pro přípravu randomizačních směsí byly standardy TGs. Příslušný TG (5,0 mg) byl přenesen do tenkostěnné ampule a vnitřní strany byly opláchnuty 40  $\mu\text{l}$  hexanu (vysušený na molekulových sítích). Posléze byl do této ampule přenesen druhý TG (5,0 mg) a bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  hexanu (vysušený na molekulových sítích). Tato směs byla dána pod proud argonu z důvodu snížení objemu na 100  $\mu\text{l}$ . Poté byl přidán methanolát sodný (5,0 mg) a 100  $\mu\text{l}$  hexanu (vysušený na molekulových sítích). Ampule s reakční směsí byla přenesena do suchého ledu a pod proudem Ar argonu byl snížen objem na 200  $\mu\text{l}$ . Následně byla ampule zatavena pomocí sklářského kahanu. Zatavená ampule byla vložena do vodní lázně o teplotě 80  $^{\circ}\text{C}$  na dobu 30 min. Po vyjmutí z vodní lázně se randomizační směs nechala ochladit na laboratorní teplotu.

### 3.5.6 Tenkovrstvá chromatografie

#### 3.5.6.1 Analytická tenkovrstvá chromatografie

Pro analytickou TLC randomizačních směsí byly použity skleněné destičky (35x75mm) se silikagelem (silikagel 60G, Merck) obsahujícím 12 % sádry. Na TLC destičku byl skleněnou kapilárou nanesen vzorek a následně byla destička vyvíjena v mobilní fázi hexan:diethylether (80:20, v/v). Pro analytickou Ag-TLC vzorku VC byly využity skleněné destičky (35x75mm) se silikagelem (silikagel 60G, Merck) obsahující 12 % sádry a 10 % dusičnanu stříbrného. Po nanesení vzorku TGs skleněnou kapilárou se nechala destička vyvíjet v mobilní fázi chloroform:methanol (99:1, v/v).<sup>42</sup> Destičky byly vyvíjeny ve skleněných vanách do výšky asi 0,5 cm pod horní okraj desky. Po odpaření rozpouštědla byla provedena destruktivní vizualizace separovaných zón sprejováním 0,01% vanilinem v kyselině sírové (w/v) a následným spalováním horkovzdušnou pistolí.



### 3.5.6.2 Preparativní a semipreparativní tenkovrstvá chromatografie

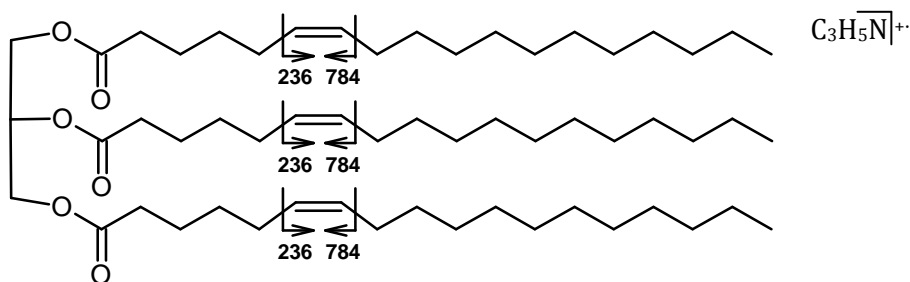
Preparativní TLC pro izolace TGs z randomizačních směsí byla prováděna na skleněných destičkách (65x75 mm) se silikagelem (silikagel 60G, Merck), který obsahoval 12 % sádry. Desky byly před použitím předčištěny směsí chloroform:methanol (1:1, v/v). Vzorek po randomizaci byl naředěn 200  $\mu$ l hexanu. Pokud se jednalo o vzorek špatně rozpustný v hexanu, byl naředěn 200  $\mu$ l směsí hexan:diethylether (80:20, v/v). Kvůli vysoké koncentraci TGs v randomizačním vzorku byl celkový objem rozdělen na dvě TLC destičky, aby se zamezilo jejímu přesycení. Pro nanášení vzorku byly použity skleněné kapiláry. Destičky se nechaly vyvíjet ve skleněných vanách s mobilní fází hexan:diethylether (80:20, v/v). Semipreparativní TLC oleje z černého rybízu byla prováděna na stejných skleněných destičkách, jako izolace TGs z randomizačních směsí. Vzorek rybízového oleje (frakce TGs, 2 mg/ml), který byl rozpuštěn v chloroformu, byl nanesen pomocí skleněné kapiláry na TLC destičku a poté se destička nechala vyvíjet ve skleněné vaně se stejnou mobilní fází jako randomizační směsí TGs. Pro izolaci nenasycených TGs pomocí Ag-TLC bylo použito skleněných desek (65x75 mm) se silikagelem (silikagel 60G, Merck), který obsahoval 12 % sádry a 10 % dusičnanu stříbrného. Na TLC destičku byl pomocí skleněné kapiláry nanesen vzorek VC (frakce TGs, 2 mg/ml). Mobilní fází pro vyvíjení destiček byla směs chloroform:methanol (99:1, v/v). Destičky se nechaly vyvíjet do výšky asi 0,5 cm pod její horní okraj. V případě randomizačních směsí a TGs z oleje černého rybízu byla po vypaření rozpouštědla provedena nedestruktivní vizualizace 5% rhodaminem 6G v ethanolu (w/v) a osvětlení pomocí UV lampy (254 nm). Destičky se vzorkem VC byly vizualizovány pomocí 0,1% 4', 5'-dichlorfluoresceinu v methanolu (w/v) a osvětleny UV lampou (254 nm). Příslušná zóna byla seškrábnuta do skleněné kolonky (vnitřní průměr 1 cm) naplněné přечиštěnou vatou, převrstvenou asi 1 cm vysokou vrstvou silikagelu. V případě randomizačních směsí a oleje z černého rybízu byla směs vymyta čerstvě destilovaným diethyletherem. Zóna ze vzorku VC byla vymyta čerstvě destilovaným chloroformem. Vzniklý roztok byl odpařen do sucha a vzorek byl rozpuštěn v čerstvě destilovaném chloroformu (1 ml). Takto připravené vzorky byly uchovávány v -25 °C.

## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 APCI-MS standardů triacylglycerolů

Pro studium lokalizace dvojných vazeb bylo vybráno 14 komerčních standardů s jednou až šesti dvojnými vazbami. Standardy TGs rozpuštěné v chloroformu byly analyzovány pomocí hmotnostního spektrometru LCQ Fleet s APCI. Pro každý analyzovaný standard byla kolizní energie, izolační šířka a délka časového záznamu nastavována individuálně. Jelikož se jedná o nově vyvinutou metodu, není dosud zavedena žádná nomenklatura, která by popisovala ionty charakterizující polohu dvojné vazby v daném TG. V této práci se vychází z označování užívané pro voskové estery.<sup>9, 83</sup> Fragmenty charakterizující polohu dvojné vazby obsahující esterovou skupinu se označují  $\alpha$ . Písmenu  $\omega$  náleží část TG, která neobsahuje esterovou skupinu.

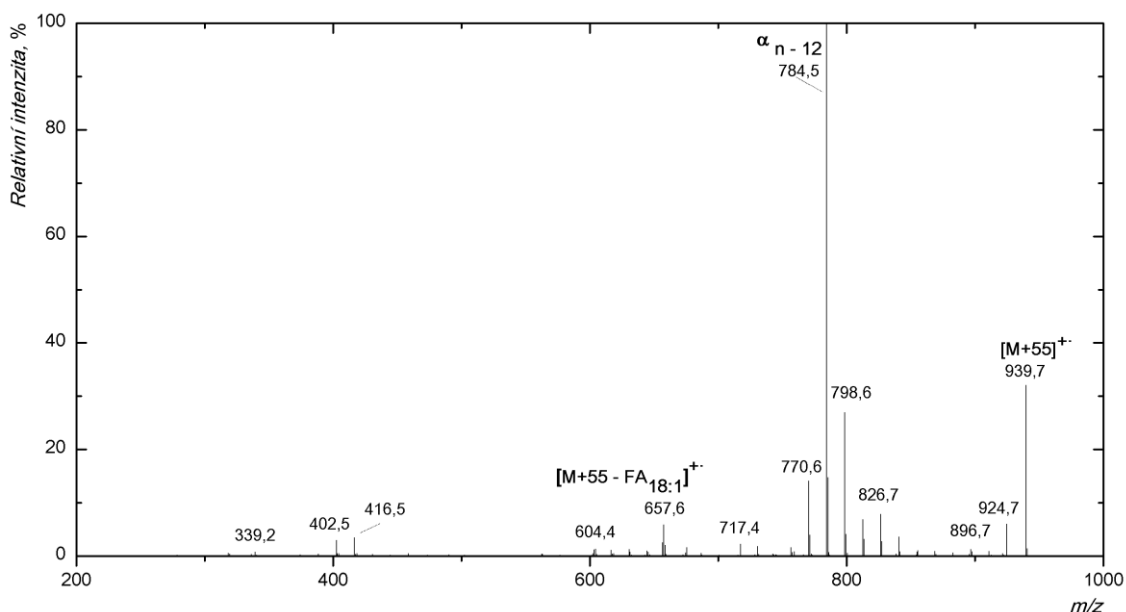
Hmotnostní spektra na Obr. 4.2 – Obr. 4.14 (str. 31 – 37) odpovídají aduktům nenasycených TGs s dvojnými vazbami v různých polohách a s různou délkou uhlovodíkových řetězců. Díky využití APCI a acetonitrilu jako mobilní fáze byl v MS spektrech přítomen spolu s molekulovým aduktem  $[M+H]^+$  také ion  $[M+C_3H_5N]^+$  ( $[M+55]^+$ ). Fragmentační spektra CID i PQD ukazují, že ke štěpení aduktu  $[M+55]^+$  docházelo na C-C vazbě před a za dvojnou vazbou. Společným rysem všech APCI-MS/MS fragmentačních CID spekter byla přítomnost iontu odpovídajícího ztrátě jedné FA. U některých hmotnostních spekter standardů TGs, např. Obr. 4.11 (str. 35) se vyskytuje ion, který formálně odpovídá ztrátě FA z  $[M+H]^+$ . Tento ion pravděpodobně vzniká odštěpením neutrální částice 54 Da z  $[M+55-FA]^+$  a je ve spektrech označován jako  $[M+55-54-FA]^+$ . Krom štěpení vazeb C-C před a za dvojnou vazbou docházelo také ke štěpení vazby C-C v poloze mezi  $\alpha$  a  $\beta$  uhlíkem nebo  $\beta$  a  $\gamma$  uhlíkem vzhledem k dvojné vazbě. Tyto satelitní ionty se od sebe a od iontu odpovídajícímu ve spektrech dvojné vazbě liší o 14 Da.



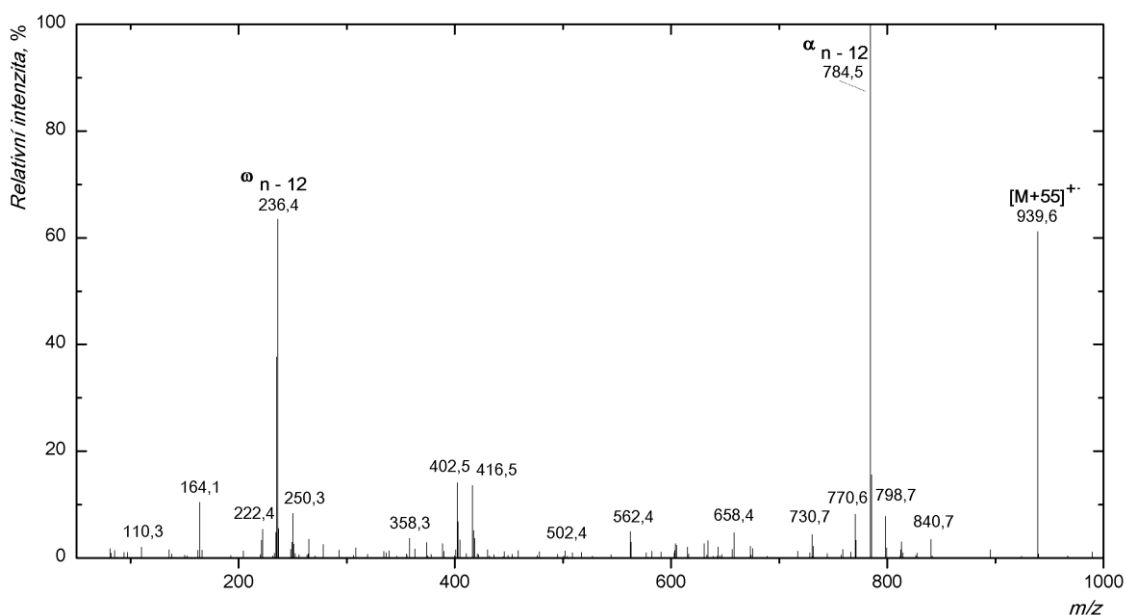
Obr. 4.1 Struktura tripetroselininu a štěpení vazeb C-C před a za dvojnou vazbou. Šipky ukazují, kde dochází ke štěpení vazeb C-C před a za dvojnou vazbou, čísla pod nimi udávají hodnotu  $m/z$ , která je viditelná ve spektru aduktu  $[M+55]^+$ .

Obr. 4.1 ilustruje, kde dochází ke štěpení vazeb C-C v uhlovodíkových řetězcích acylů kyseliny petroselinové. Na Obr. 4.2 (str. 31) je APCI-MS/MS CID spektrum aduktu tripetroselininu  $[M+55]^+$   $m/z$  939,7. Tento TG obsahuje jednu dvojnou vazbu v každém z řetězců v poloze  $n-12$ . Nejintenzivnější ion  $m/z$  784,5 označený  $\alpha_{n-12}$  odpovídá poloze dvojné vazby. Ion  $m/z$  657,6 představuje ztrátu kyseliny petroselinové z  $[M+C_3H_5N]^+$ .

Obr. 4.3 zobrazuje APCI-MS/MS PQD spektrum aduktu  $[M+55]^+$ , kde je navíc zřetelný ion  $m/z$  236,4, který odpovídá iontu  $\omega_{n-12}$ .



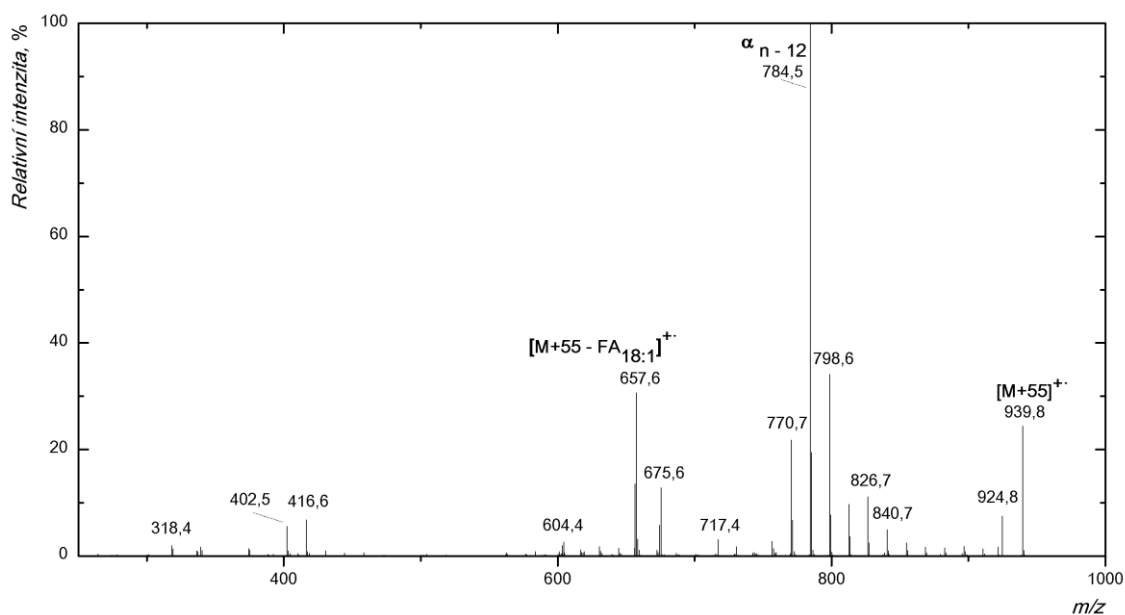
Obr. 4.2 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu tripetroselininu  $[M+55]^+$ . Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 0,9 Da, kolizní energie činila 31,0 % a intenzita spektra  $7,93 \cdot 10^1$  a.u..



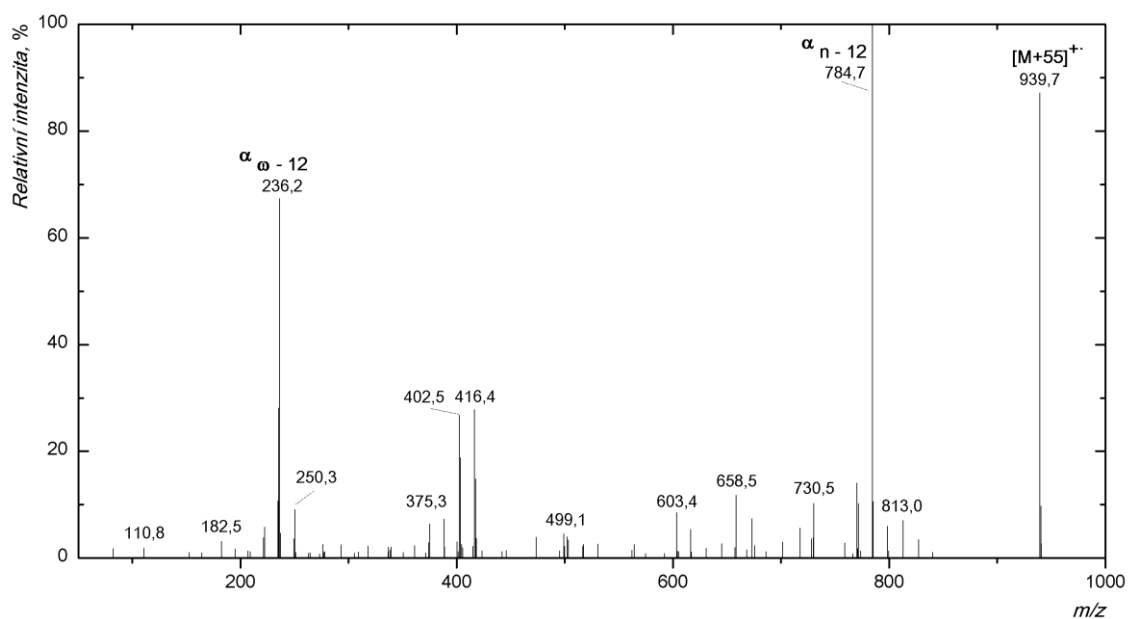
Obr. 4.3 APCI-MS/MS spektrum (PQD) aduktu tripetroselininu  $[M+55]^+$ . Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 0,9 Da, kolizní energie činila 33,5 % a intenzita spektra  $4,51 \cdot 10^{-1}$  a.u..

Hmotnostní spektra aduktu tripetroselininu (Obr. 4.2 a Obr. 4.3), kde se dvojná vazba nachází v *cis* uspořádání, jsou velice podobná hmotnostním spektrům tripetroselaidinu (Obr. 4.4 a Obr. 4.5, str. 32), který má dvojnou vazbu ve stejné poloze, ale v upořádání typu *trans*. Intenzity těchto spekter jsou srovnatelné. Ze spekter je zřejmé, že je tato metoda

použitelná jak pro TGs, kde jsou dvojné vazby v pozici *cis* i *trans*. Nelze však rozlišit, v jaké konfiguraci se dvojné vazby nacházejí.



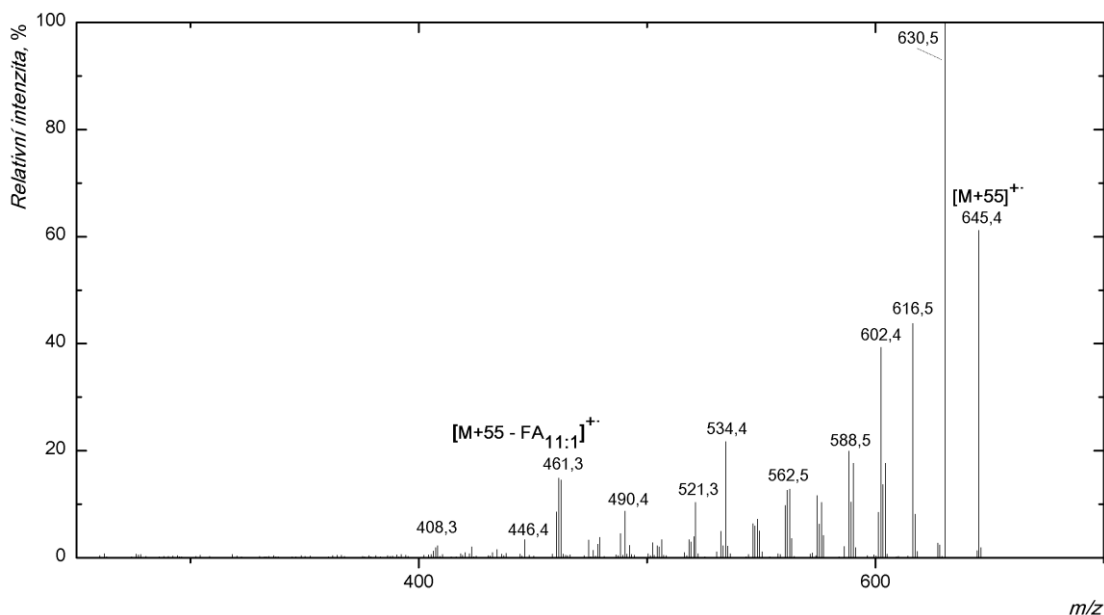
Obr. 4.4 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu tripetroselaidinu  $[M+55]^+$ . Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 0,5 Da, kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra  $4,35 \cdot 10^1$  a.u..



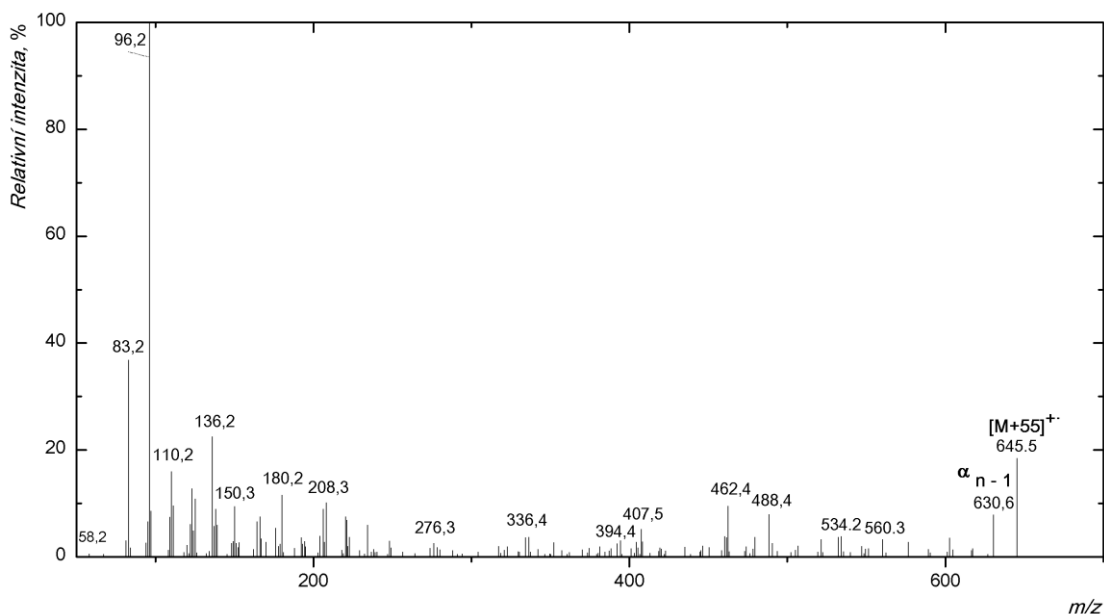
Obr. 4.5 APCI-MS/MS spektrum (PQD) aduktu tripetroselaidinu  $[M+55]^+$ . Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 0,5 Da, kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra  $3,08 \cdot 10^{-1}$  a.u..

Poněkud odlišná spektra byla získána fragmentací TGs s dvojnou vazbou na konci acylů (n-1). V případě triundecenoinu bylo fragmentací iontu  $m/z$  645,4 získáno spektrum APCI-MS/MS CID aduktu  $[M+55]^+$ , znázorněné na Obr. 4.6 (str. 33). Nejintenzivnější ion  $m/z$  630,5 odpovídá neutrální ztrátě 15 Da, tj. ztrátě methylového radikálu pravděpodobně pocházejícího z části iontu obsahujícího  $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}$ . Hmotnostní spektrum

APCI-MS/MS aduktu  $[M+55]^+$  v typu aktivace PQD je zobrazeno na Obr. 4.7, kde je zřetelný ion  $m/z$  96,2. Tento ion odpovídá fragmentaci mezi uhlíky  $\alpha$  a  $\beta$  vzhledem k dvojné vazbě.

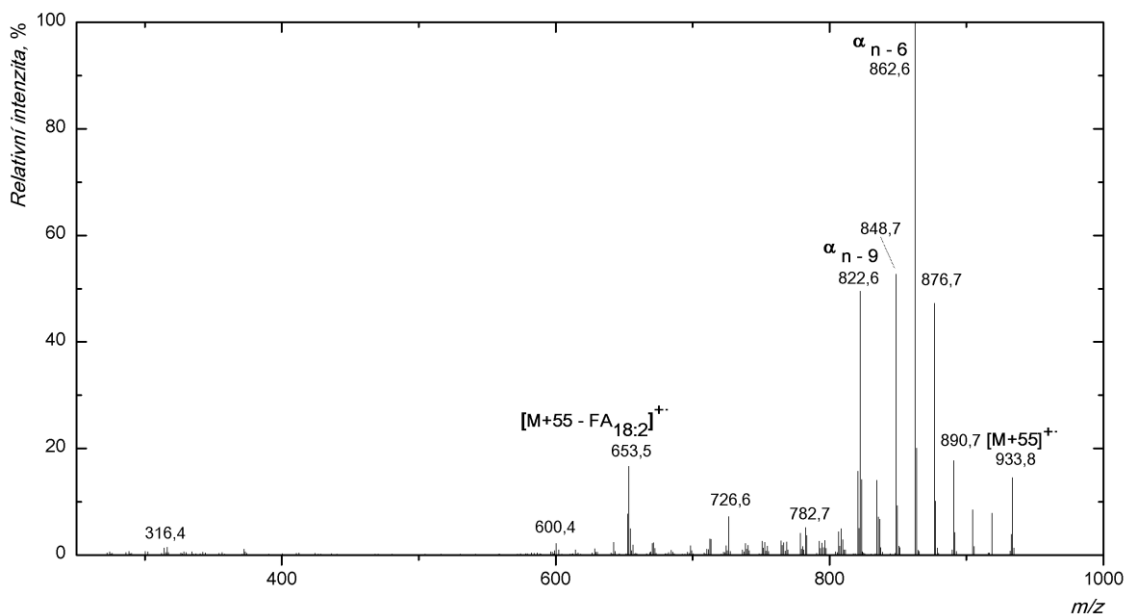


Obr. 4.6 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu triundecenoinu  $[M+55]^+$ . Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,0 Da, kolizní energie činila 27,5 % a intenzita spektra  $2,34 \cdot 10^1 \text{ a.u.}$

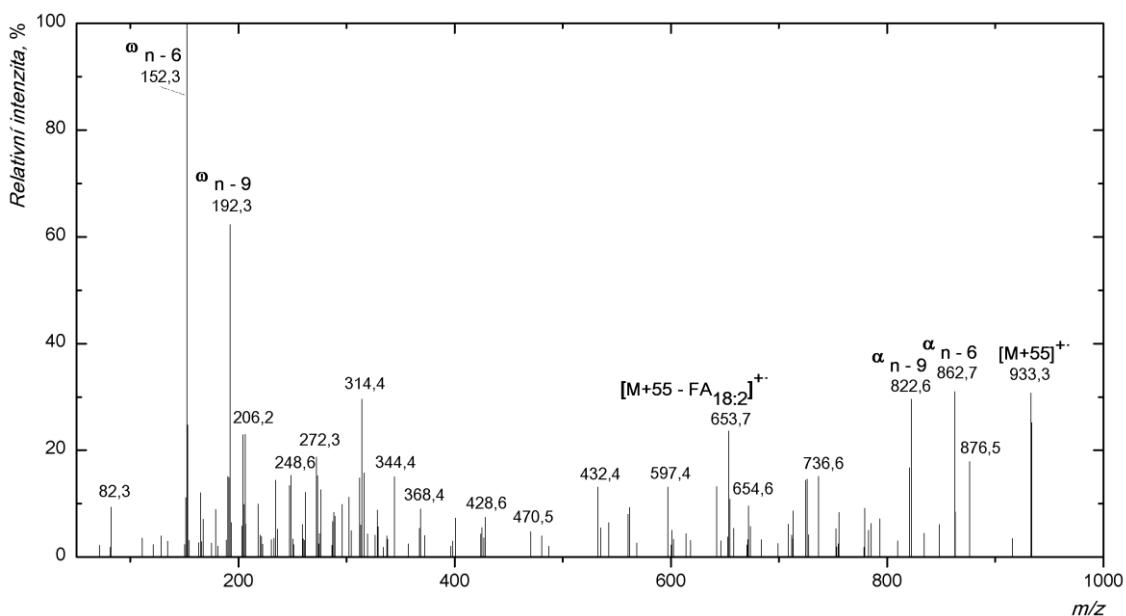


Obr. 4.7 APCI-MS/MS spektrum (PQD) aduktu triundecenoinu  $[M+55]^+$ . Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,0 Da, kolizní energie činila 31,5 % a intenzita spektra  $5,48 \cdot 10^{-1} \text{ a.u.}$

TGs s di- a trinenasycenými acyly se fragmentují obdobným způsobem jako TGs obsahující mononenasycené acyly. Toto demonstrují hmotnostní spektra na Obr. 4.8 – Obr. 4.11 (str. 34 – 35). Nejintenzivnější ionty ve spektru odpovídají štěpení vedle dvojných vazeb. Je zde rovněž charakteristická ztráta FA.

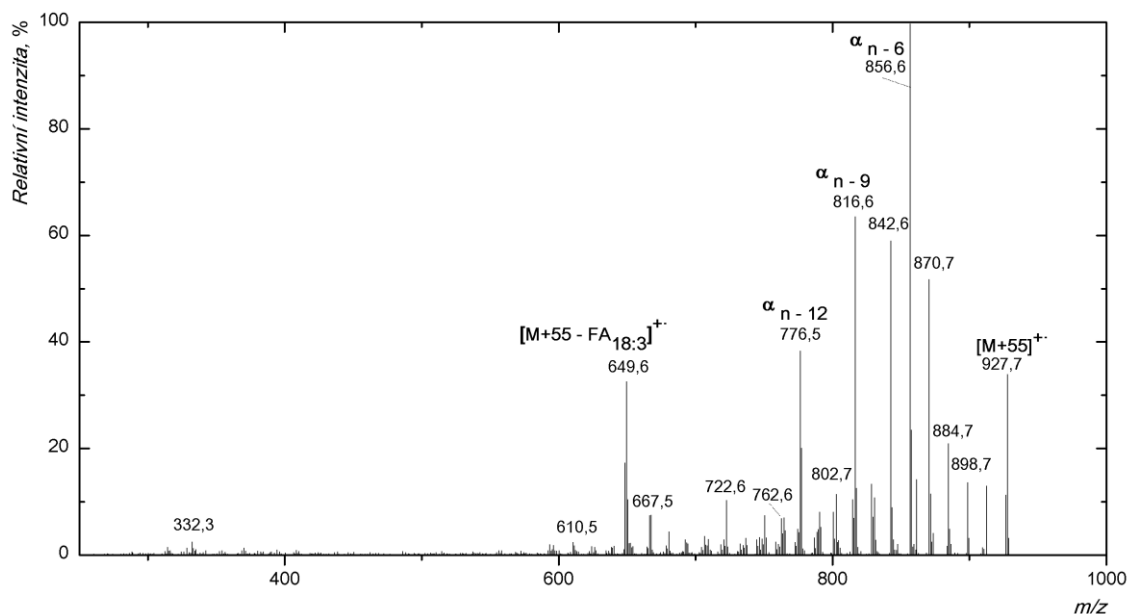


Obr. 4.8 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu trilinoleinu  $[M+55]^+$ . Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 0,4 Da, kolizní energie činila 32,0 % a intenzita spektra  $5,15 \cdot 10^1$  a.u..

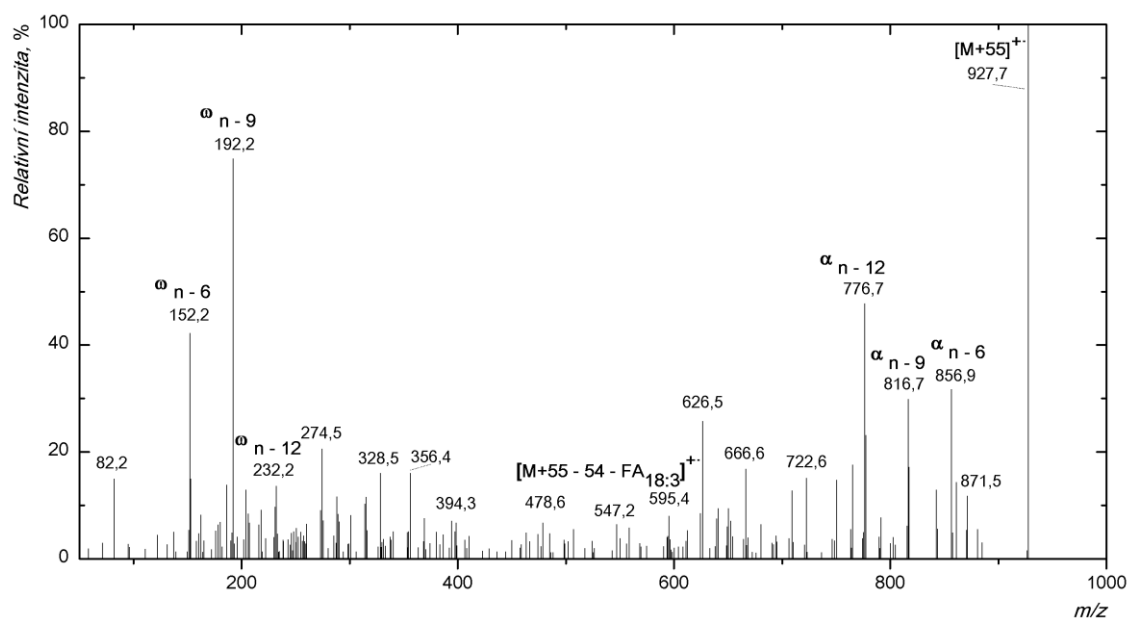


Obr. 4.9 APCI-MS/MS spektrum (PQD) aduktu trilinoleinu  $[M+55]^+$ . Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 0,4 Da, kolizní energie činila 35,0 % a intenzita spektra  $1,15 \cdot 10^{-1}$  a.u..

Obr. 4.8 představuje APCI-MS/MS spektrum aduktu trilinoleinu  $[M+55]^+$  po CID aktivaci. Tento TG obsahuje dvě dvojné vazby v každém acylu. Fragmentovaný ion  $m/z$  933,8 poskytuje ionty  $m/z$  862,6 a  $m/z$  822,6, které jsou určující pro polohu dvojných vazeb v TG. Ion  $m/z$  653,5 náleží ztrátě kyseliny linolové. Spektrum po PQD aktivaci je na Obr. 4.9 a  $\omega$  ionty  $m/z$  152,3 a  $m/z$  192,3 odpovídají štěpení vazby C-C na opačné straně dvojných vazeb. Je zde možné vidět i ionty, které nesou esterovou vazbu a jsou označeny  $\alpha$ . Rovněž se vyskytuje ion, který odpovídá ztrátě FA.



Obr. 4.10 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu trigama linoleninu [M+55]<sup>+-</sup>. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500 μl/min, šířka izolačního okna 0,6 Da, kolizní energie činila 32,5 % a intenzita spektra  $3,18 \cdot 10^1$  a.u..

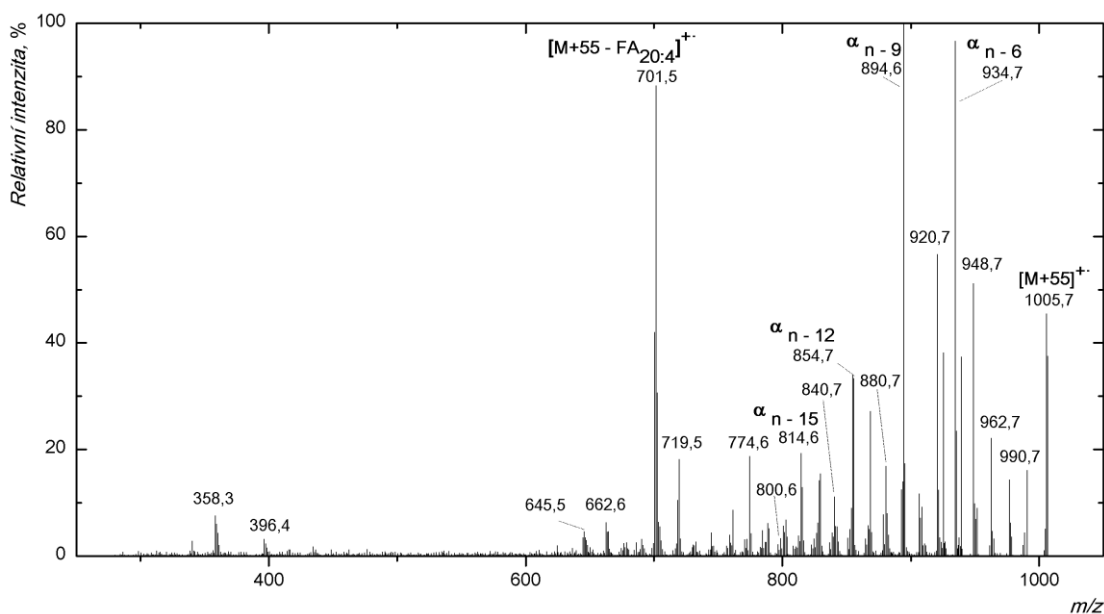


Obr. 4.11 APCI-MS/MS spektrum (PQD) aduktu trigama linoleninu [M+55]<sup>+-</sup>. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500 μl/min, šířka izolačního okna 0,8 Da, kolizní energie činila 34,5 % a intenzita spektra  $1,13 \cdot 10^{-1}$  a.u..

Trigama linolenin je TG s třemi dvojnými vazbami v každém acylu. V APCI-MS/MS CID spektru aduktu [M+55]<sup>+-</sup> (Obr. 4.10) jsou jasně viditelné α ionty  $m/z$  856,6,  $m/z$  816,6 a  $m/z$  776,5, které vznikly fragmentací iontu  $m/z$  927,7. Fragmenty odpovídají štěpení vazeb C-C, které leží ihned vedle dvojných vazeb. Nachází se zde také ion  $m/z$  649,6 odpovídající ztrátě FA gama linolenové. APCI-MS/MS spektrum (PQD) aduktu trigama linoleninu na Obr. 4.11 je kromě iontů určujících polohu dvojných vazeb, tedy ω ionty  $m/z$  152,2,  $m/z$  192,2 a  $m/z$  232,2, také ion  $m/z$  595,4. Tento ion odpovídá ztrátě 54 Da a ztrátě FA od

aduktu  $[M+55]^+$ , tedy  $[M+55-54-FA_{18:3}]^+$ . Fragmentací iontu  $m/z$  927,7 vznikají též fragmenty  $\alpha_{n-12}$ ,  $\alpha_{n-9}$  a  $\alpha_{n-6}$ .

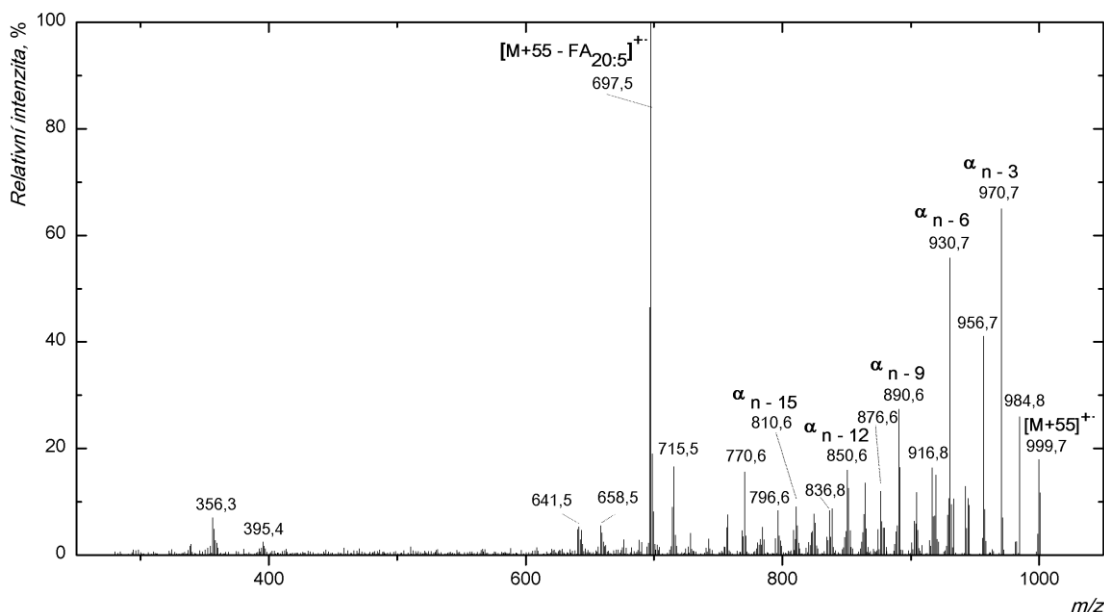
Hmotnostní spektra na Obr. 4.12 – Obr. 4.14 (str. 36 – 37) odpovídají fragmentaci aduktu TG se čtyřmi a více dvojnými vazbami. Při analýze analytů muselo být užito širšího izolačního okna než u předchozích molekul s jednou až třemi dvojnými vazbami. Důvodem použití širšího izolačního okna bylo dosažení vyšší intenzity spekter aduktů těchto polynenasycených TGs. PQD spektra těchto látek mají velice malou intenzitu a ionty důležité pro lokalizaci dvojných vazby nejsou mnohdy přítomny ani po dlouhém časovém záznamu. Proto zde nejsou tato spektra prezentována.



Obr. 4.12 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu triarachidoninu  $[M+55]^+$ . Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,3 Da a kolizní energie činila 33,7 % a intenzita spektra  $1,67 \cdot 10^1$  a.u..

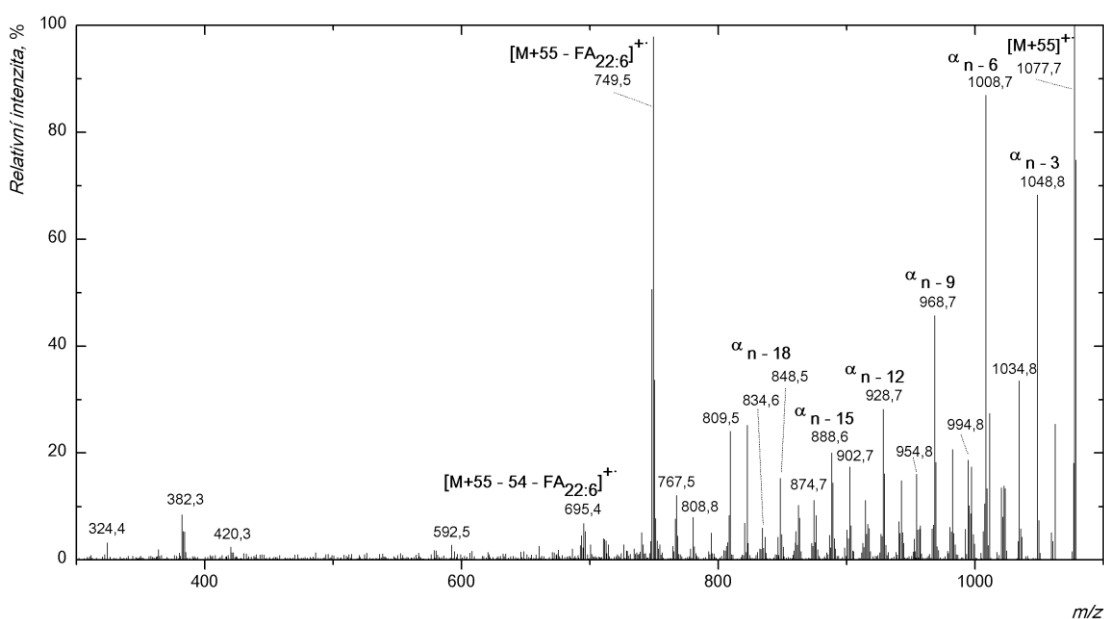
Na Obr. 4.12 je APCI-MS/MS CID spektrum aduktu triarachidoninu  $[M+55]^+$ . Ionty  $\alpha$   $m/z$  934,7,  $m/z$  894,6,  $m/z$  854,7 a  $m/z$  814,6 odpovídají polohám dvojných vazby v tomto TG, tedy polohám n-6, 9, 12, 15. Ion  $m/z$  657,6 náleží ztrátě FA.





Obr. 4.13 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu triecosapentaenoinu  $[M+55]^+$ . Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,2 Da a kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra  $1,20 \cdot 10^1$  a.u..

V APCI-MS/MS spektru (CID) aduktu triecosapentaenoinu  $[M+55]^+$  na Obr. 4.13 jsou zřetelné  $\alpha$  ionty  $m/z$  970,7,  $m/z$  930,7,  $m/z$  890,6,  $m/z$  850,6 a  $m/z$  810,6, které vznikly štěpením vazby C-C vedle dvojné vazby a jsou charakteristické pro polohu dvojné vazby tohoto TG. Nejintenzivnější ion  $m/z$  697,5 odpovídá ztrátě FA.



Obr. 4.14 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu tridocosahexaenoinu  $[M+55]^+$ . Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,5 Da a kolizní energie činila 33,5 % a intenzita spektra  $1,54 \cdot 10^1$  a.u..

Z intenzivních  $\alpha$  iontů  $m/z$  1048,8  $m/z$  1008,7,  $m/z$  968,7,  $m/z$  928,7,  $m/z$  888,6 a  $m/z$  848,5 v APCI-MS/MS spektru (CID) aduktu  $[M+55]^+$  na Obr. 4.14 lze určit polohu

dvojných vazeb u tridokosaehaenoinu. Ion  $m/z$  749,5 odpovídá ztrátě kyseliny dokosaehaenové.

Další APCI-MS/MS spektra aduktů standardů TGs  $[M+55]^+$  v typu aktivace CID i PQD jsou uvedena v Kap. 7 (Přílohy, str. 65 -70).

## 4.2 APCI-MS standardů triacylglycerolů připravených randomizací

Většina komerčně dostupných standardů obsahuje všechny acyly shodné, a proto bylo cílem randomizační syntézy připravit TGs obsahující různé acyly. Výchozími látkami pro randomizační reakce byly komerční standardy TGs. Provedením těchto reakcí a izolací pomocí preparativní TLC byly získány vzorky TGs uvedené v Tab. 4.1.

Tab. 4.1 Syntetizované vzorky TGs. Randomizační směs byla tvořena TG č. 1 a TG č. 2.

Číslo směsi	TG č. 1	TG č. 2
1	Tristearin	Triundecenoin (n - 1 <i>cis</i> )
2	Tristearin	Tripetroselinin (n - 12 <i>cis</i> )
3	Tristearin	Tripetroselaidin (n - 12 <i>trans</i> )
4	Tristearin	Triolein (n - 9 <i>cis</i> )
5	Tristearin	Trielaidin (n - 9 <i>trans</i> )
6	Tristearin	Trivacenin (n - 7 <i>cis</i> )
7	Tristearin	Trilinolein (n - 6, 9 <i>cis</i> )
8	Tristearin	Trilinoelaidin (n - 6, 9 <i>trans</i> )
9	Tristearin	Trilinolenin (n - 3, 6, 9 <i>cis</i> )
10	Tristearin	Trigama linolenin (n - 6, 9, 12 <i>cis</i> )
11	Tristearin	Triarachidonin (n - 6, 9, 12, 15 <i>cis</i> )
12	Tristearin	Triekosapentaenoin (n - 3, 6, 9, 12, 15 <i>cis</i> )
13	Tristearin	Tridokosaehaenoin (n - 3, 6, 9, 12, 15, 18 <i>cis</i> )
14	Tripetroselinin (n - 12 <i>cis</i> )	Triolein (n - 9 <i>cis</i> )
15	Tripetroselinin (n - 12 <i>cis</i> )	Trilinolein (n - 6, 9 <i>cis</i> )
16	Tripetroselinin (n - 12 <i>cis</i> )	Trilinoelaidin (n - 6, 9 <i>trans</i> )
17	Tripetroselinin (n - 12 <i>cis</i> )	Trilinolenin (n - 3, 6, 9 <i>cis</i> )
18	Tripetroselinin (n - 12 <i>cis</i> )	Trigama linolenin (n - 6, 9, 12 <i>cis</i> )
19	Tripetroselinin (n - 12 <i>cis</i> )	Triarachidonin (n - 6, 9, 12, 15 <i>cis</i> )
20	Tripetroselinin (n - 12 <i>cis</i> )	Triekosapentaenoin (n - 3, 6, 9, 12, 15 <i>cis</i> )
21	Tripetroselinin (n - 12 <i>cis</i> )	Tridokosaehaenoin (n - 3, 6, 9, 12, 15, 18 <i>cis</i> )
22	Trivacenin (n - 7 <i>cis</i> )	Trilinolein (n - 6, 9 <i>cis</i> )
23	Trivacenin (n - 7 <i>cis</i> )	Trilinoelaidin (n - 6, 9 <i>trans</i> )
24	Trivacenin (n - 7 <i>cis</i> )	Trilinolenin (n - 3, 6, 9 <i>cis</i> )
25	Trivacenin (n - 7 <i>cis</i> )	Trigama linolenin (n - 6, 9, 12 <i>cis</i> )
26	Trivacenin (n - 7 <i>cis</i> )	Triarachidonin (n - 6, 9, 12, 15 <i>cis</i> )
27	Trivacenin (n - 7 <i>cis</i> )	Triekosapentaenoin (n - 3, 6, 9, 12, 15 <i>cis</i> )

Číslo směsi	TG č. 1	TG č. 2
28	Triolein (n - 9 <i>cis</i> )	Trilinolein (n - 6, 9 <i>cis</i> )
29	Triolein (n - 9 <i>cis</i> )	Trilinoelaidin (n - 6, 9 <i>trans</i> )
30	Triolein (n - 9 <i>cis</i> )	Trilinolenin (n - 3, 6, 9 <i>cis</i> )
31	Triolein (n - 9 <i>cis</i> )	Trigama linolenin (n - 6, 9, 12 <i>cis</i> )
32	Triolein (n - 9 <i>cis</i> )	Triarachidonin (n - 6, 9, 12, 15 <i>cis</i> )
33	Triolein (n - 9 <i>cis</i> )	Triecosapentaenoin (n - 3, 6, 9, 12, 15 <i>cis</i> )
34	Triolein (n - 9 <i>cis</i> )	Tridocosaehaenoin (n - 3, 6, 9, 12, 15, 18 <i>cis</i> )
35	Trilinolein (n - 6, 9 <i>cis</i> )	Trilinolenin (n - 3, 6, 9 <i>cis</i> )
36	Trilinolein (n - 6, 9 <i>cis</i> )	Trigama linolenin (n - 6, 9, 12 <i>cis</i> )
37	Trilinolein (n - 6, 9 <i>cis</i> )	Triarachidonin (n - 6, 9, 12, 15 <i>cis</i> )
38	Trilinolein (n - 6, 9 <i>cis</i> )	Triecosapentaenoin (n - 3, 6, 9, 12, 15 <i>cis</i> )
39	Trilinolein (n - 6, 9 <i>cis</i> )	Tridokosaehaenoin (n - 3, 6, 9, 12, 15, 18 <i>cis</i> )
40	Trilinolenin (n - 3, 6, 9 <i>cis</i> )	Triarachidonin (n - 6, 9, 12, 15 <i>cis</i> )
41	Trilinolenin (n - 3, 6, 9 <i>cis</i> )	Triecosapentaenoin (n - 3, 6, 9, 12, 15 <i>cis</i> )
42	Trilinolenin (n - 3, 6, 9 <i>cis</i> )	Tridokosaehaenoin (n - 3, 6, 9, 12, 15, 18 <i>cis</i> )
43	Trigama linolenin (n - 6, 9, 12 <i>cis</i> )	Triarachidonin (n - 6, 9, 12, 15 <i>cis</i> )
44	Trigama linolenin (n - 6, 9, 12 <i>cis</i> )	Triecosapentaenoin (n - 3, 6, 9, 12, 15 <i>cis</i> )

Randomizační reakcí se podařilo připravit 44 kombinací TGs. V každé směsi byly obsaženy TGs, které obsahovaly FA reakčních TGs. K navázání FA došlo náhodně a vznikly tak i izomerní TGs.

Během provádění randomizační syntézy bylo patrné, že u polynenasycených TGs je výtěžek reakce menší než u mono-, di- nebo trinenasycených TGs. V MS spektrech byl signál molekulového aduktu  $[M+H]^+$  syntetizovaných TGs nízký a nejintenzivnější signál vykazovaly nezreagované TGs. Signály aduktu  $[M+55]^+$  produktů byly často na úrovni šumu. Vyhodnocení fragmentačních spekter tedy nebylo v některých případech možné z důvodu velice nízké intenzity spektra i přes použití izolační šířky okna nad 2,0 Da.

#### 4.2.1 Optimalizace randomizace

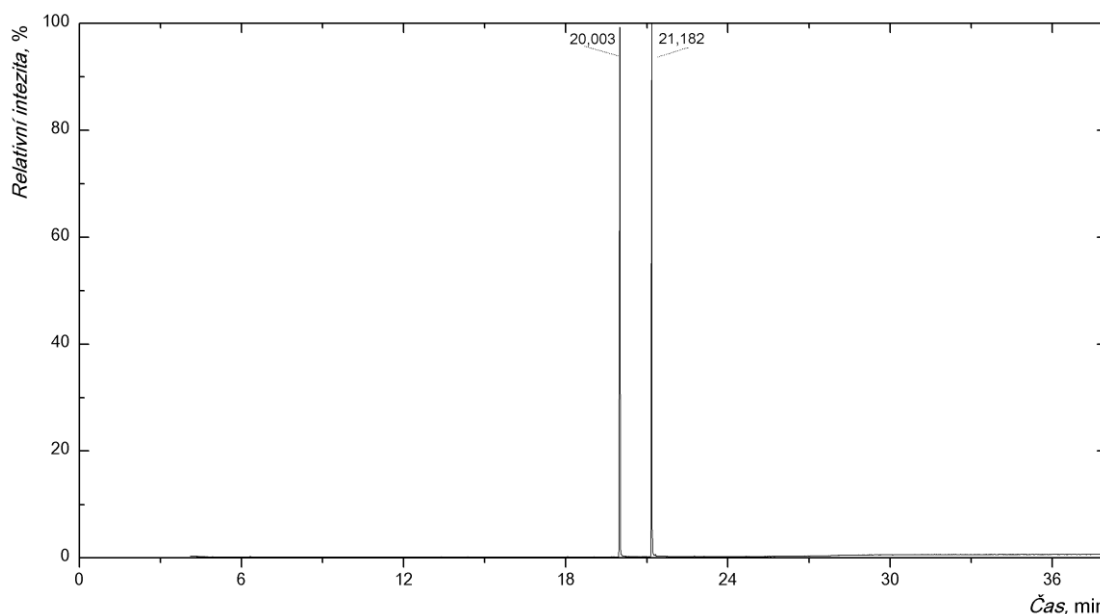
Randomizace v mikroměřítku byla nejprve prováděna ve vialce, do které byl naváženo příslušné množství obou standardů TGs (5 mg + 5 mg). Směs byla rozpuštěna v 400  $\mu$ l hexanu a bylo přidáno 20 mg methanolátu sodného. Tato směs byla promíchána a vložena do vodní lázně o teplotě 75 °C na dobu 30 minut. Po zchlazení směsi na laboratorní teplotu bylo přidáno 10  $\mu$ l vody (deionizovaná), aby byla celá reakce zastavena. Pro vysušení přebytečné vody byl přidán bezvodý síran hořečnatý a směs byla promíchána. Dále probíhala filtrace přes vat, kdy ve skleněné Pasteurově pipetě byl asi 1 cm vysoký sloupec vaty. Takto provedenou reakcí vznikaly nepožadované FAMES (ověřené pomocí TLC a GC/MS). Proto se přistoupilo k optimalizaci reakčních podmínek: vyhřívání ultrazvuková lázeň, delší reakční doba (až 3 hodiny) při teplotě 75 °C, 24 hodinová reakční doba při pokojové teplotě, úprava množství methanolátu sodného i přidávané vody, záměna rozpouštědla (místo používaného hexanu byl použit isooktan). Jelikož i po těchto změnách převládaly ve vzorku FAMES, bylo snahou minimalizovat případné stopy vody v reakční směsi. Reakce se nechala probíhat 24 hodin v míchané vodní lázni o teplotě 75 °C, kdy jako rozpouštědlo byl použit hexan vysušený na

molekulových sítích. Na TLC byly již identifikovány vznikající TGs, ale FAMES byly stále v majoritním zastoupení. Následně i po úpravách reakční doby bylo přistoupeno k vysušení methanolátu sodného pomocí síranu hořečnatého (1:1, w/w). Po dalších úpravách reakčních podmínek se přistoupeno k randomizaci prováděné v ampulích, aby se zcela zamezilo kontaminaci vodou či jejími parami. V tomto okamžiku byla optimalizována teplota na 80 °C a odstranění methanolátu sodného se dosáhlo přidáním vody, vysušením síranem hořečnatým a následnou filtrací přes vat. Posléze se zjistilo, že při delším uchovávání vzorku rozpuštěného v chloroformu při – 25 °C, docházelo stále k tvorbě FAMES (ověřeno GC/MS analýzou). Předpokládalo se, že ve vzorku byl stále ještě přítomný methanolát sodný v minoritním množství. Proto byla do postupu zavedena izolace TGs pomocí preparativní TLC, aby se zabránilo kontaminaci vzorku methanolátem sodným.

#### 4.2.2 GC/MS methylesterů mastných kyselin

Během optimalizace randomizačních reakcí v mikroměřítku vznikaly FAMES. Jejich přítomnost byla ověřována pomocí TLC a GC/MS analýzy.

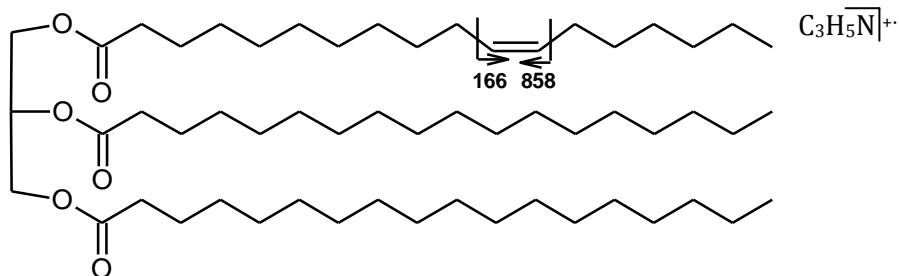
Na Obr. 4.15 je zobrazen chromatogram randomizační směsi, kde výchozími látkami byly tristearin a triarachidonin. Touto analýzou byl potvrzen vznik FAMES. Pík v 20. minutě odpovídá methylesteru kyseliny stearové a pík v 21. minutě methylesteru kyseliny arachidonové.



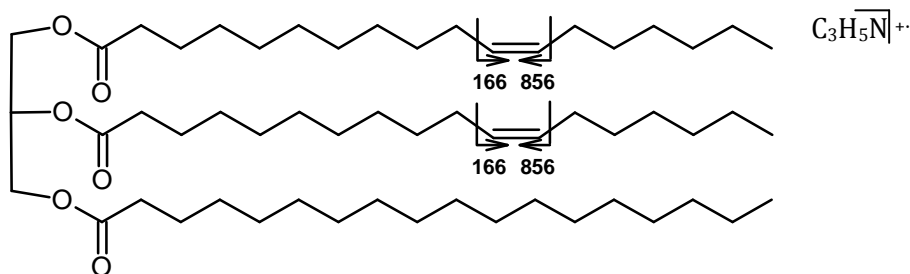
Obr. 4.15 GC/MS chromatogram methylesteru kyseliny stearové a methylesteru kyseliny arachidonové. Experimentální podmínky jsou uvedeny v Kap. 3.5.4.

### 4.2.3 APCI-MS vzorků připravených randomizací

Na Obr. 4.16 je znázorněn TG, který obsahuje jeden acyl kyseliny vakcenové a dva acyly kyseliny stearové. Obr. 4.17 ilustruje strukturu TG s dvěma acyly kyseliny vakcenové a jedním acylem kyseliny stearové. Šipky ukazují, kde dochází ke štěpení vazby C-C a pod nimi je hmota  $m/z$ , která je viditelná ve spektrech aduktů  $[M+55]^+$ .

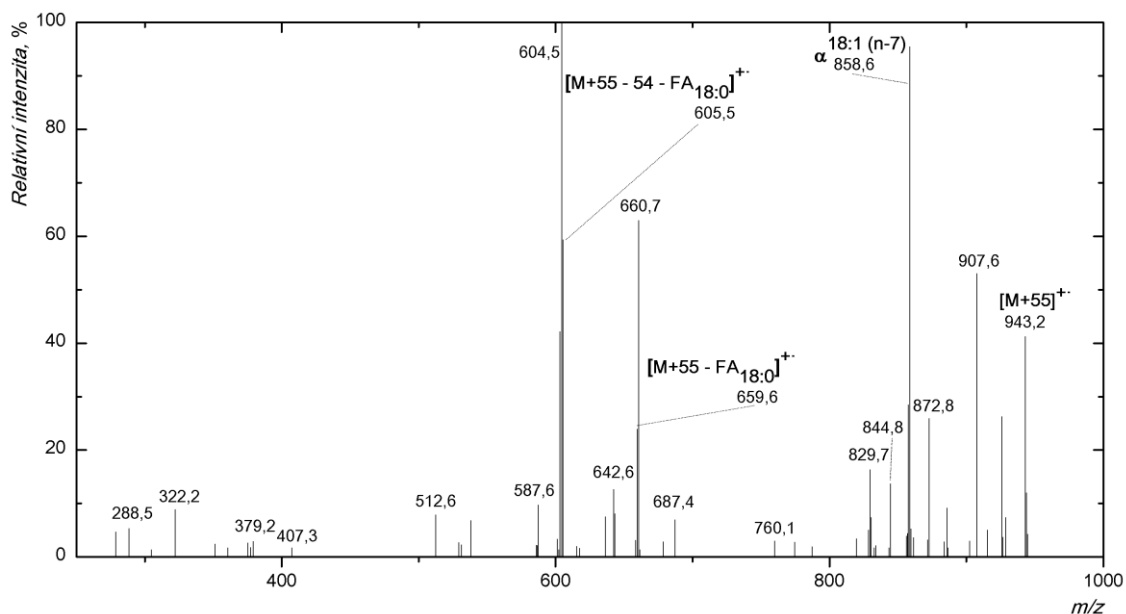


Obr. 4.16 Struktura TG, který obsahuje jeden acyl kyseliny vakcenové a dva acyly kyseliny stearové. Šipky ukazují, kde dochází ke štěpení vazeb C-C před a za dvojnou vazbou, čísla pod nimi vyjadřují hodnotu  $m/z$ , která je ve spektru aduktu  $[M+55]^+$ .

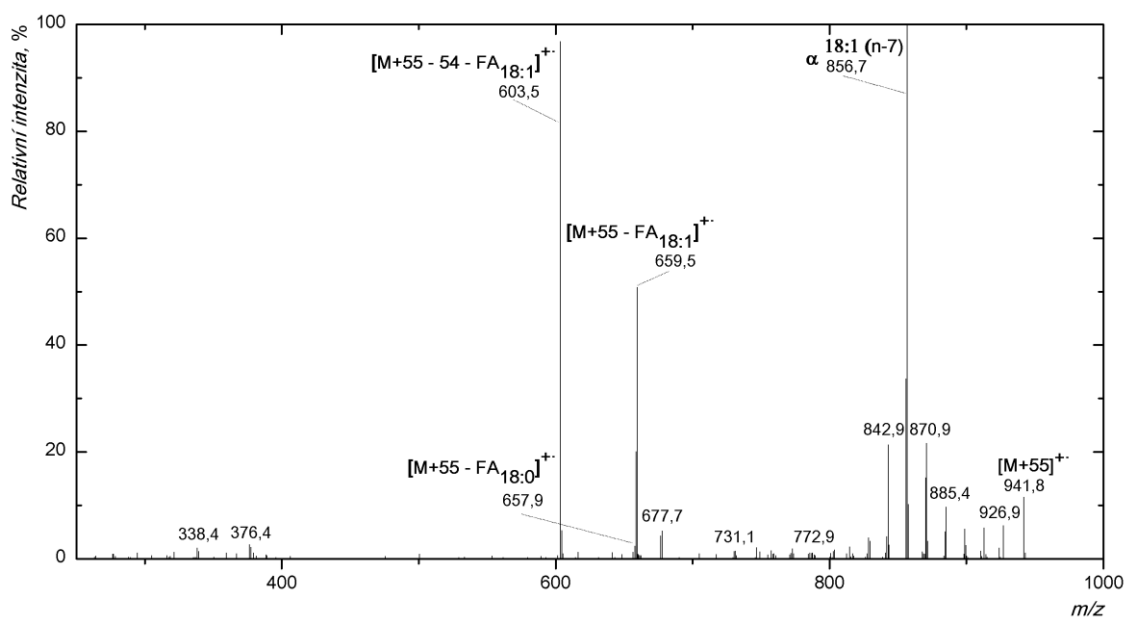


Obr. 4.17 Struktura TG, který obsahuje jeden acyl kyseliny stearové a dva acyly kyseliny vakcenové. Šipky ukazují, kde dochází ke štěpení vazeb C-C před a za dvojnou vazbou, čísla pod nimi vyjadřují hodnotu  $m/z$ , která je ve spektru aduktu  $[M+55]^+$ .

Na Obr. 4.18 a 4.19 (str. 42) lze vidět, že lokalizace dvojných vazeb je možná i pokud nejsou všechny acyly nenasycené. Nejintenzivnější ion v APCI-MS/MS CID spektru aduktu  $[M+55]^+$   $m/z$  858,6 na Obr. 4.18 odpovídá poloze dvojně vazby v tomto TG. Dalším intenzivním iontem je  $m/z$  605,5, který formálně náleží ztrátě kyseliny stearové z  $[M+H]^+$ . Tento TG obsahuje pouze jednu nenasycenou FA, a to kyselinu vakcenovou. V APCI-MS/MS CID spektru aduktu  $[M+55]^+$ , který obsahuje dva acyly kyseliny vakcenové, je na Obr. 4.19. Dle zřetelného  $\alpha$  iontu  $m/z$  856,7 lze určit dvojně vazby v TG.



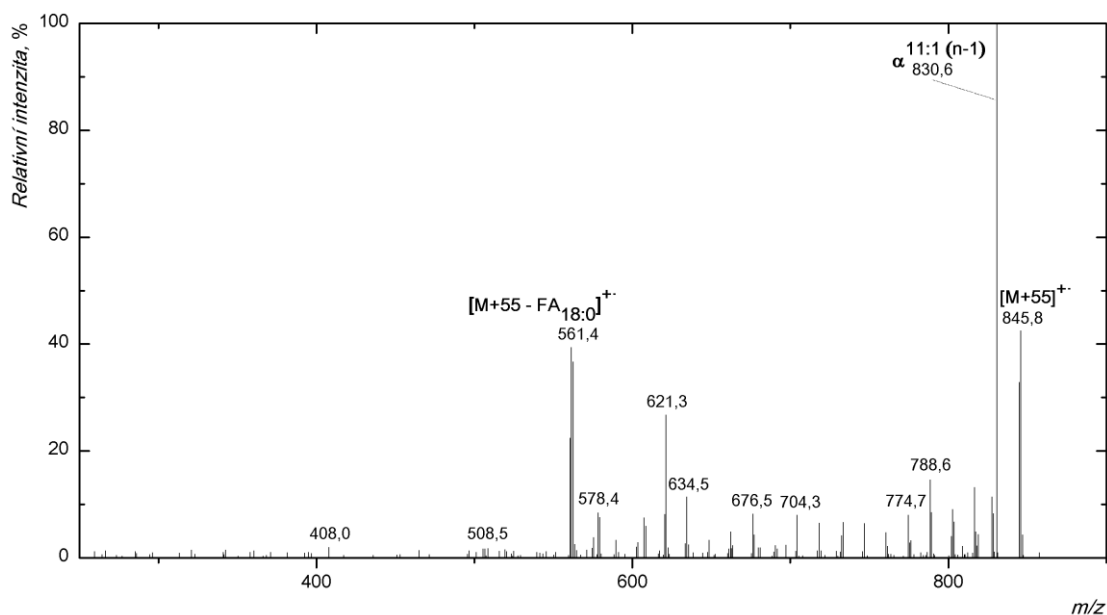
Obr. 4.18 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a trivacceninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny vakcenové a dva acyly kyseliny stearové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 2,0 Da a kolizní energie činila 33,0 % a intenzita spektra  $4,51 \cdot 10^{-1}$  a.u..



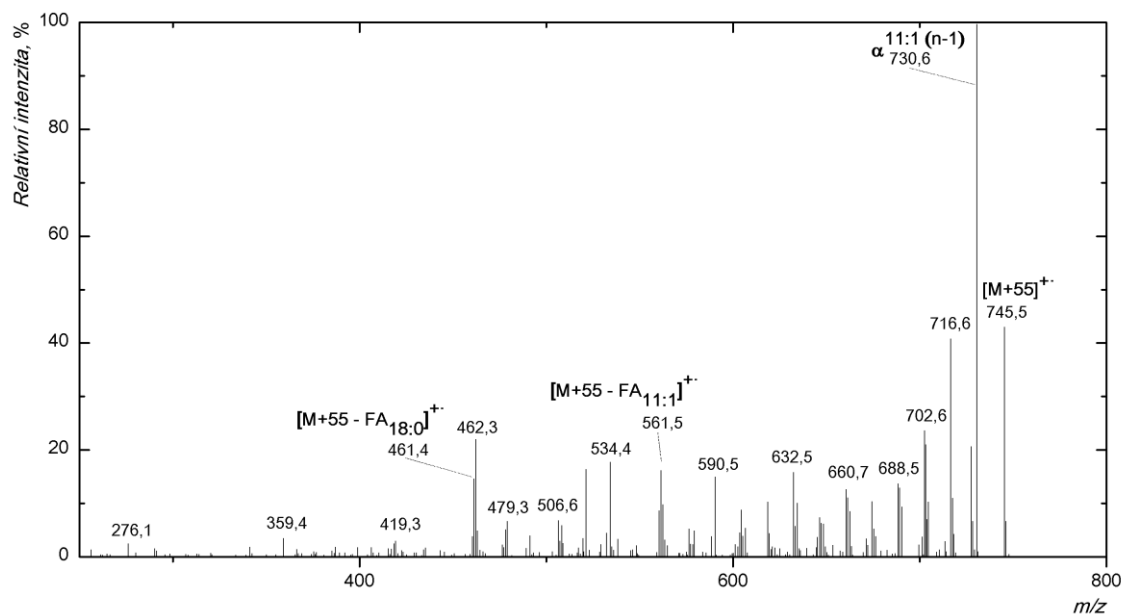
Obr. 4.19 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a trivacceninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny stearové a dva acyly kyseliny vakcenové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra 2,53 a.u..

Příklady spekter s aduktem  $[M+55]^+$  TG, který obsahuje dvojnou vazbu na konci acylu je na Obr. 4.20 a 4.21 (str.43). V tomto případě TG obsahuje jeden (Obr. 4.20) nebo dva (Obr. 4.21) acyly kyseliny undecylové, jež mají dvojnou vazbu v poloze n-11. Intenzivní ion  $m/z$  830,6 (Obr. 4.20) a ion  $m/z$  730,6 (Obr. 4.21) odpovídá ztrátě 15 Da z fragmentovaného iontu, tedy methylového radikálu pravděpodobně pocházejícího z části obsahující  $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}$ . Ion  $m/z$  561,4 na Obr. 4.20 odpovídá ztrátě kyseliny stearové. Ztrátu

kyseliny undecylové nelze pozorovat, jelikož  $C_3H_5N^{+}$  se váže v tomto případě na jedinou vazbu v TG.



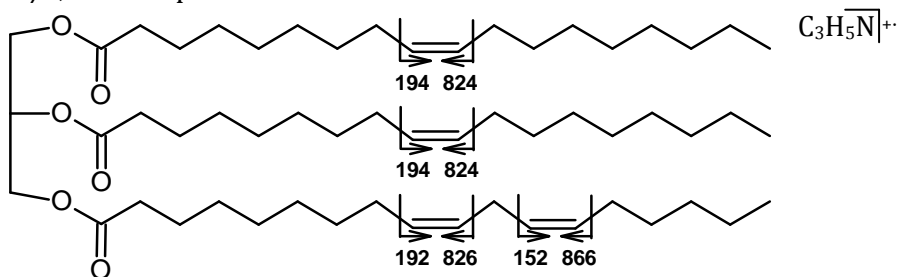
Obr. 4.20 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a triundecenoinu  $[M+55]^{+}$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny undecylové a dva acyly kyseliny stearové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 1,9 Da, kolizní energie činila 32,5 % a intenzita spektra  $7,06 \cdot 10^{-1}$  a.u..



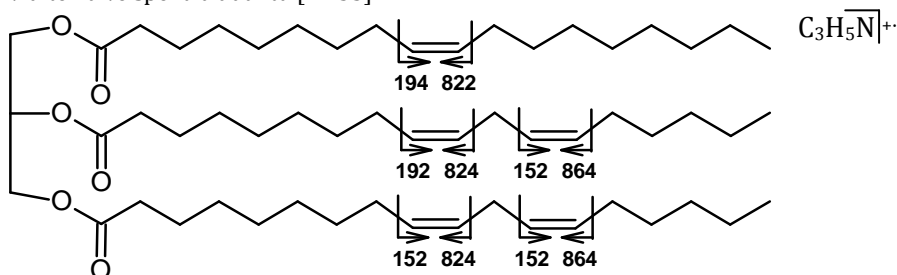
Obr. 4.21 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a triundecenoinu  $[M+55]^{+}$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny stearové a dva acyly kyseliny undecylové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 1,3 Da, kolizní energie činila 30,0 % a intenzita spektra  $8,55 \cdot 10^{-1}$  a.u..

Na Obr. 4.24 – Obr. 4.27 (str. 45 - 46) jsou fragmentační spektra adutků TGs, které vznikly kombinací mononenasycených TGs a dinenasycených TGs o stejné délce uhlovodíkového řetězce. Obr. 4.22 (str. 44) ukazuje strukturu TG, jenž obsahuje jednu kyselinu linolovou a dvě kyseliny olejové. Obr. 4.23 (str. 44) znázorňuje TG, který má na

svém glycerolovém řetězci jednu kyselinu olejovou a dvě kyseliny linolové. Na těchto strukturách je také ukázáno, kde dochází ke štěpení vazby C-C a pod šipkami je hodnota  $m/z$ , která odpovídá dané části TG.



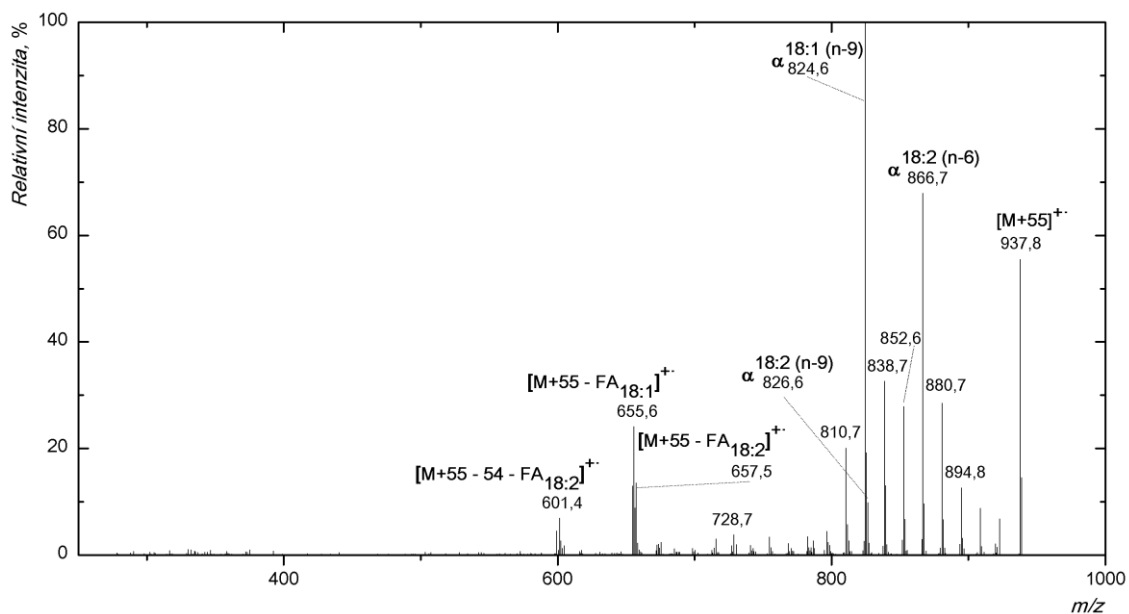
Obr. 4.22 Struktura TG, který obsahuje jeden acyl kyseliny linolové a dva acyly kyseliny olejové. Šipky ukazují, kde dochází ke štěpení vazeb C-C před a za dvojnou vazbou, čísla pod nimi vyjadřují hodnotu  $m/z$ , která je viditelná ve spektru aduktu  $[M+55]^+$ .



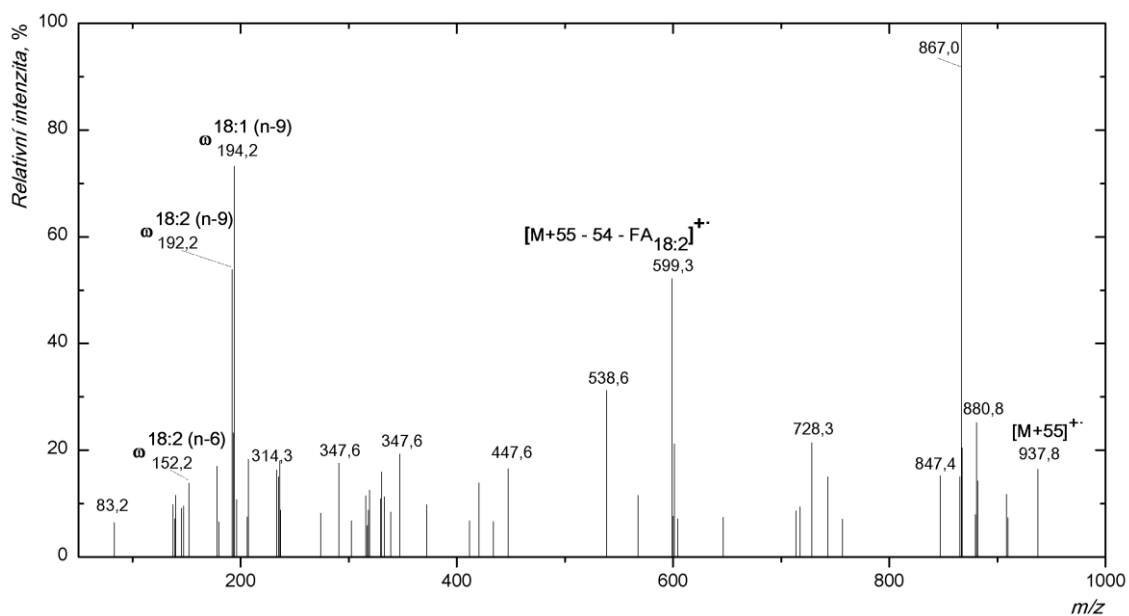
Obr. 4.23 Struktura TG, který obsahuje jeden acyl kyseliny olejové a dva acyly kyseliny linolové. Šipky ukazují, kde dochází ke štěpení vazeb C-C před a za dvojnou vazbou, čísla pod nimi vyjadřují hodnotu  $m/z$ , která je viditelná ve spektru aduktu  $[M+55]^+$ .

Nejintenzivnější píky ve spektrech typu CID (Obr. 4.24, str. 45 a Obr. 4.27, str. 46) odpovídají polohám dvojných vazeb. Jsou zde také přítomny ionty charakteristické pro ztrátu FA z aduktu  $[M+55]^+$ , tj. např. na Obr. 4.24 (str. 45) ionty  $m/z$  601,4,  $m/z$  655,6 a  $m/z$  657,5. Při měření PQD spekter (Obr. 4.25, str. 45 a Obr. 4.27, str. 46) musela být použita větší izolační šířka a rovněž vyšší kolizní energie. Spektra byla zaznamenána i po delší časový úsek, než tomu bylo u záznamu CID spekter, aby se dosáhlo vyšší intenzity spektra. Přesto, že jsou intenzity signálu velmi nízké, jsou dobře patrné  $\omega$  ionty.

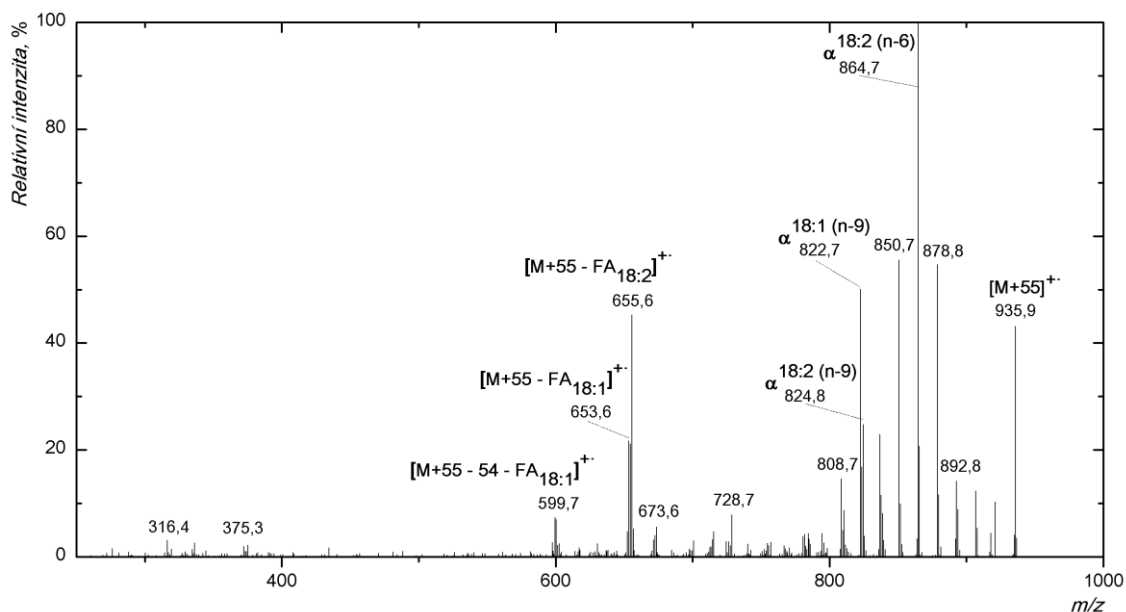




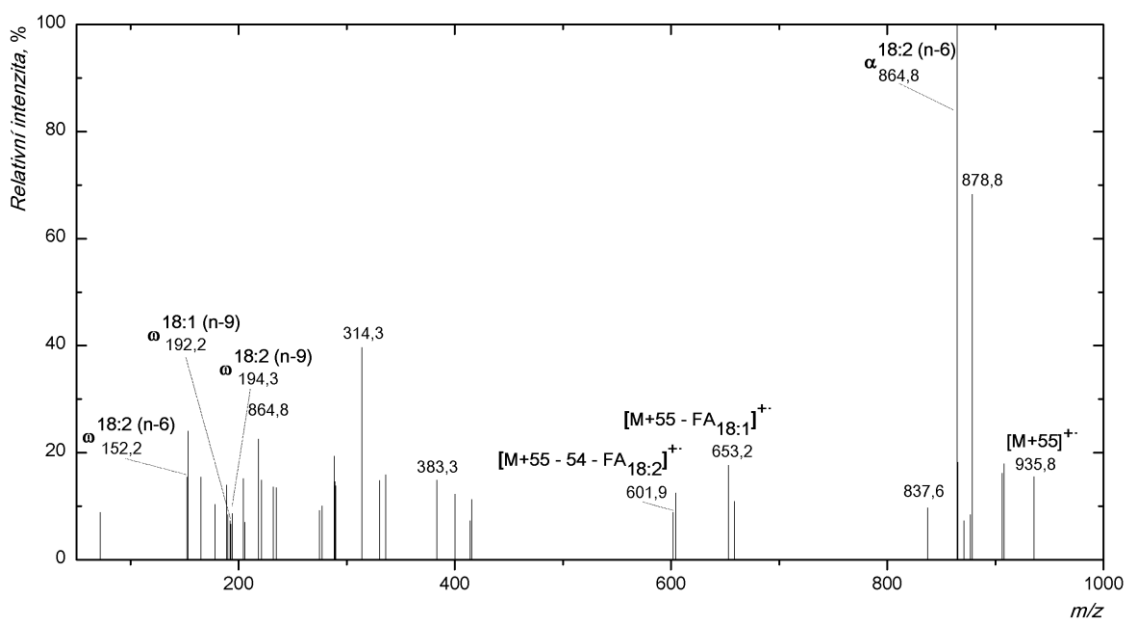
Obr. 4.24 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trioleinu a trilinoleinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny linolové a dva acyly kyseliny olejové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 33,0 % a intenzita spektra 5,86 a.u..



Obr. 4.25 APCI-MS/MS spektrum (PQD) aduktu randomizační směsi trioleinu a trilinoleinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny linolové a dva acyly kyseliny olejové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 2,0 Da, kolizní energie činila 35,0 % a intenzita spektra  $2,72 \cdot 10^{-2}$  a.u..

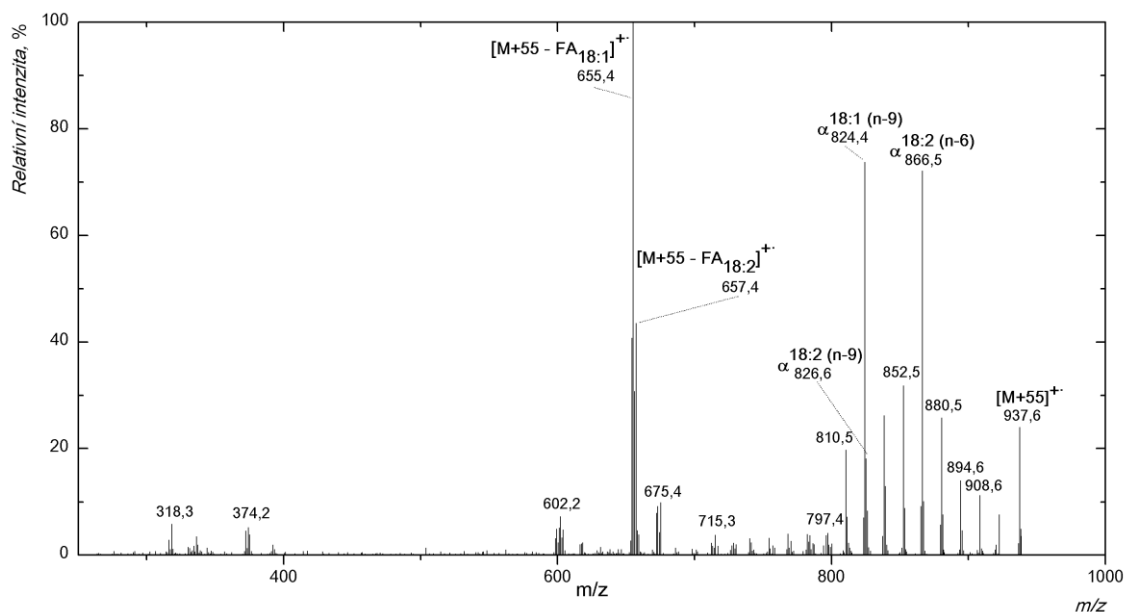


Obr. 4.26 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trioleinu a trilinoleinu [M+55]<sup>+</sup>. TG obsahuje jeden acyl kyseliny olejové a dva acyly kyseliny linolové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500 µl/min, šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra 2,37 a.u..

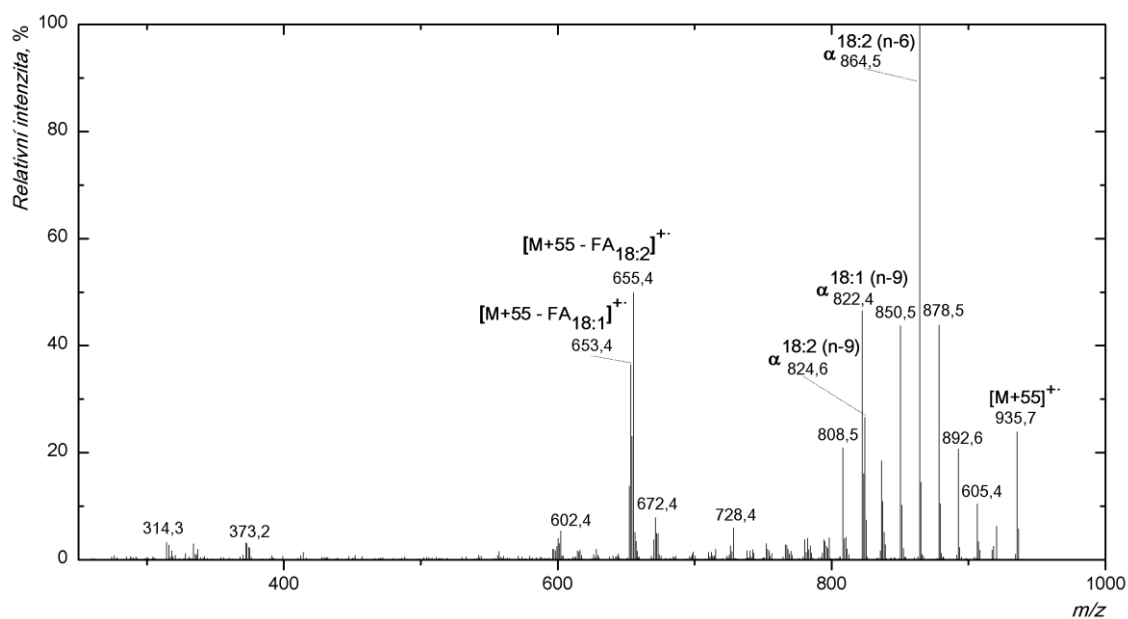


Obr. 4.27 APCI-MS/MS spektrum (PQD) aduktu randomizační směsi trioleinu a trilinoleinu [M+55]<sup>+</sup>. TG obsahuje jeden acyl kyseliny olejové a dva acyly kyseliny linolové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500 µl/min, šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra 2,37 a.u..

TGs obsahující dvojné vazby v pozici *trans* (Obr. 4.28 a Obr. 4.29, str. 47), mají srovnatelná spektra s TGs, které obsahují dvojnou vazbu v téže poloze, ale v *cis* uspořádání (Obr. 4.24, str. 45 a 4.26, str. 46).

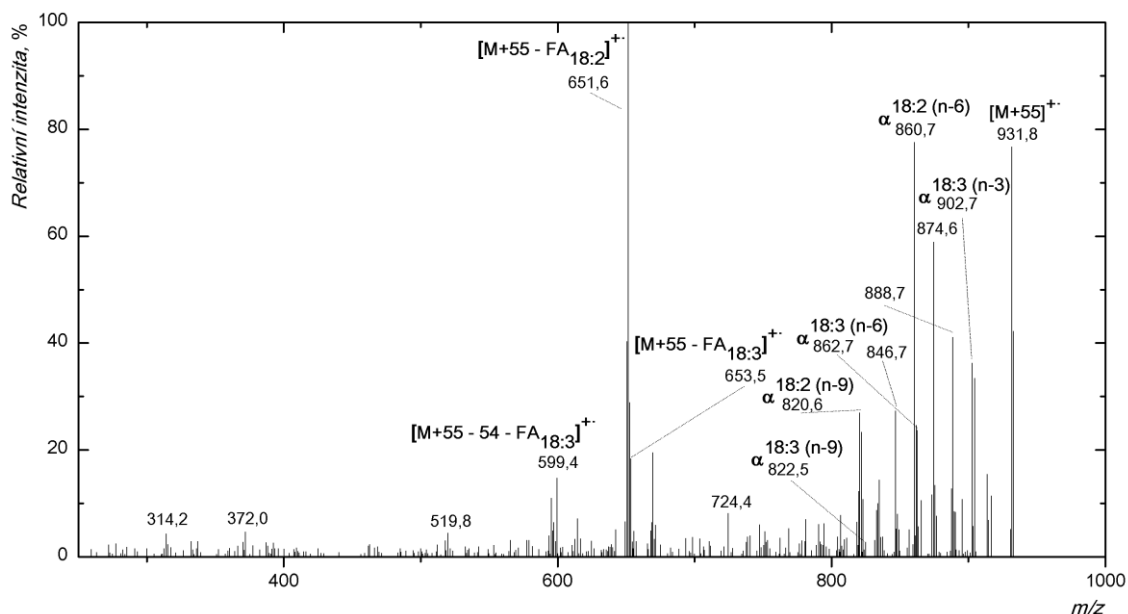


Obr. 4.28 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trioleinu a trilinoelaidinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny linoelaidové a dva acyly kyseliny olejové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,8 Da a kolizní energie činila 33,5 % a intenzita spektra  $3,37 \cdot 10^1$  a.u..

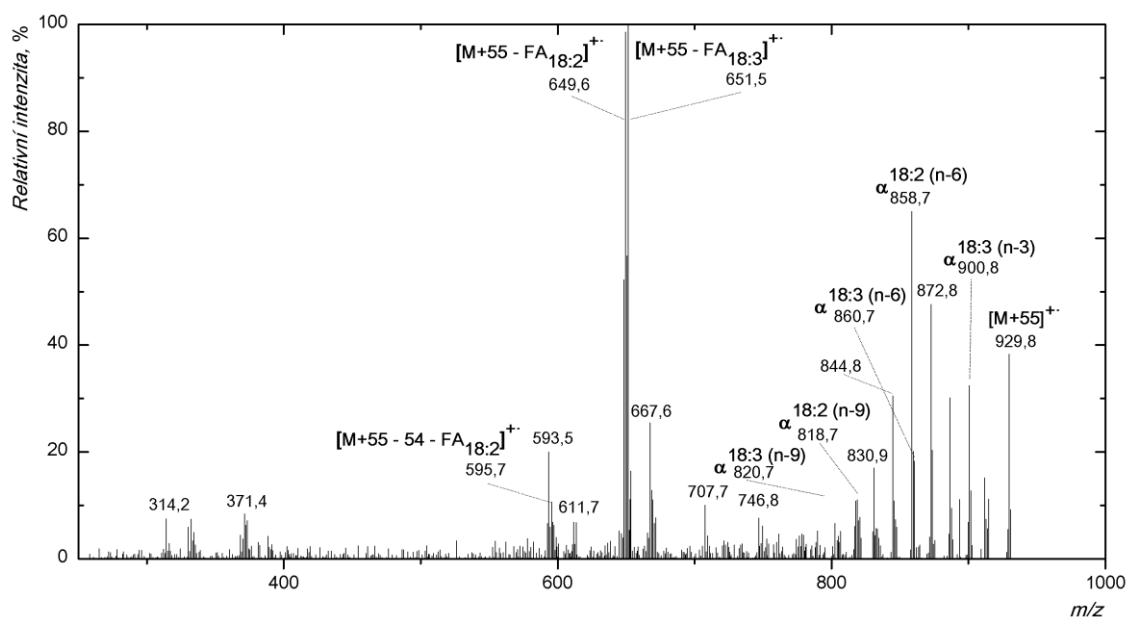


Obr. 4.29 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trioleinu a trilinoelaidinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny olejové a dva acyly kyseliny linolové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra 2,37 a.u..

APCI-MS/MS CID spektra aduktů  $[M+55]^+$  na Obr. 4.30 a Obr. 4.31 (str.48) vznikla fragmentací polynenasycených TGs. Je zřejmé, že vykazují podobné výsledky, jako tomu bylo u méně nenasycených TGs. Je nutno však použít větší šířky okna pro izolaci prekurzorů, aby bylo dosaženo dostatečné intenzity spektra.

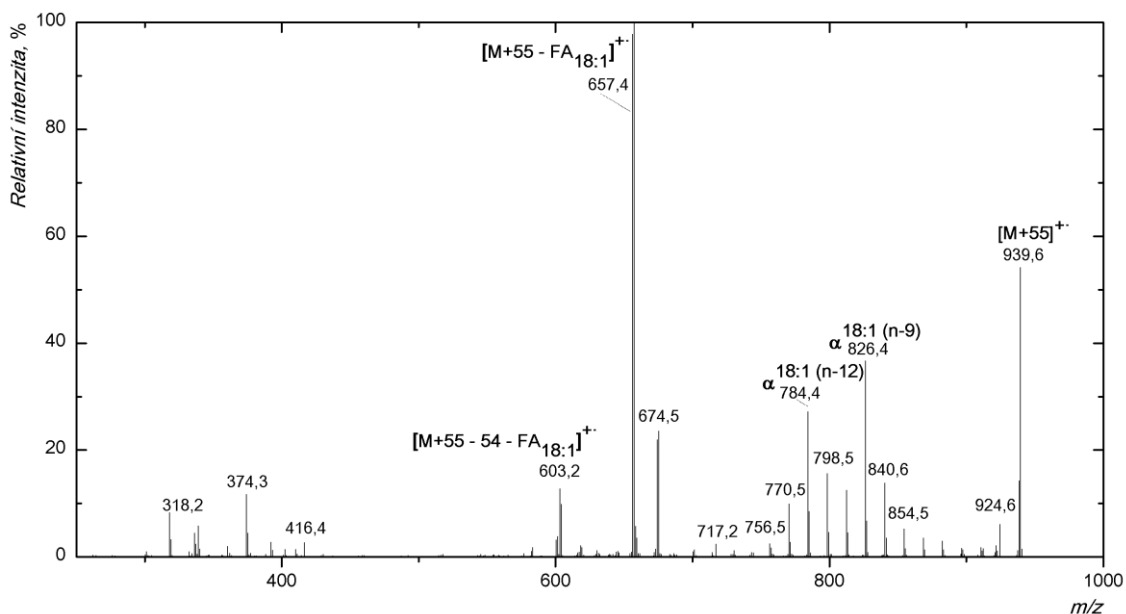


Obr. 4.30 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trilinoleinu a trialfa linoleninu  $[M+55]^{+}$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny alfa linolenové a dva acyly kyseliny linolové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 1,5 Da, kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra  $7,07 \cdot 10^{-1}$  a.u..



Obr. 4.31 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trilinoleinu a trialfa linoleninu  $[M+55]^{+}$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny linolové a dva acyly kyseliny alfa linolenové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 1,5 Da, kolizní energie činila 36,5 % a intenzita spektra 1,27 a.u..

Níže uvedené spektrum na Obr. 4.32 (str. 49) ukazuje, že je tato metoda použitelná i pro TGs, jejichž acyly mají shodný počet uhlíků v uhlovodíkovém řetězci i počet dvojných vazeb v různé poloze. Na APCI-MS/MS CID spektru aduktu  $[M+55]^{+}$  je názorné, že lze rozlišit dvojné vazby pocházející z kyseliny olejové i z kyseliny petroselinové.



Obr. 4.32 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trioleinu a tripetroselininu  $[M+55]^+$ . Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 34,5 % a intenzita spektra  $4,08 \cdot 10^1$  a.u..

Další APCI-MS/MS spektra aduktu randomizačních směsí TGs  $[M+55]^+$  jsou uvedena v Kap. 7 (Přílohy, str. 71-114).

### 4.3 HPLC-MS přírodních směsí

TGs byly separovány na chromatografické koloně a detekovány pomocí hmotnostního spektrometru. APCI-MS/MS spektra byla měřena v data-dependentním režimu, kdy v MS spektru byl identifikován hlavní ion (basepeak), který odpovídal  $[M+H]^+$ . Následně byl fragmentován ion s hodnotou  $m/z$  vyšší o 54 jednotek, tj. ion  $[M+55]^+$ .

#### 4.3.1 Postup vyhodnocování HPLC/APCI-MS<sup>2</sup> analýz přírodních směsí

Během vyhodnocování dat bylo nejdříve z MS spekter určeno, zda-li se v daném chromatografickém píku nevyskytuje více TGs. Následně se vycházelo z fragmentačních spekter molekulárního aduktu  $[M+55]^+$ . Nejprve se se hledaly ionty odpovídající ztrátám FAs, tedy  $[M+55-FA]^+$  a  $[M+55-54-FA]^+$ . Posléze se přistoupilo k určení poloh dvojných vazeb dle intenzivních  $\alpha$  iontů ve spektru. Jelikož byla použita sférická iontová past při CID aktivaci, bylo umožněno sledovat ionty až od  $m/z$  200. Ionty  $\omega$  nebylo možné identifikovat. Intenzity APCI-MS/MS PQD fragmentačních spekter byly velice nízké u standardů, tudíž nebyl tento typ aktivace použit pro určování poloh ve vzorcích přírodních směsí. Doposud nebylo zcela prověřeno, zda-li je možné touto metodou určit polohu FAs na glycerolu na základě poměrů intenzit  $[M+55-FA]^+$  nebo  $[M+55-54-FA]^+$  iontů. Pořadí acylů ve krátkých identifikovaných TGs v Tab. 4.1 – 4.3 proto nevypovídá o jejich uspořádání na glycerolu. Byla také spočítána hodnota ECN pro kontrolu, zda-li navržené struktury TGs korespondují s elučním časem.

### 4.3.2 HPLC/APCI-MS<sup>2</sup> analýzy olivového oleje

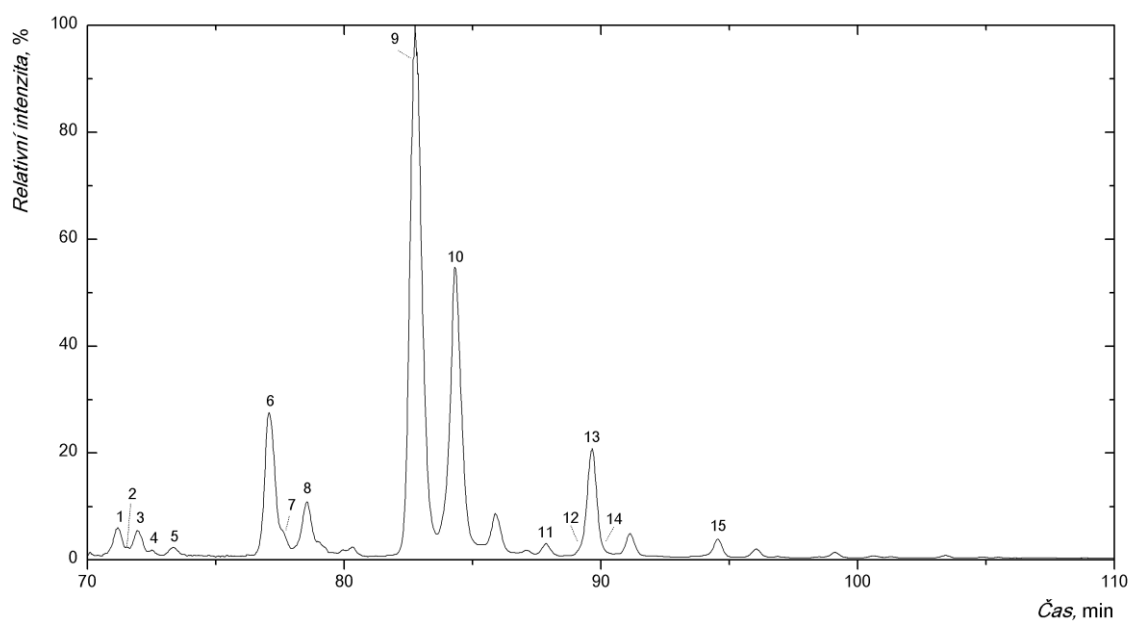
Poloha dvojně vazby ve vzorku olivového oleje byla identifikována u 15 TGs. Z literatury je známo, že olivový olej může obsahovat až 37 různých TGs.<sup>41</sup> V Tab. 4.1 jsou uvedeny identifikované TGs ve vzorku olivového oleje.

Tab. 4.1 TGs identifikované ve vzorku olivového oleje.

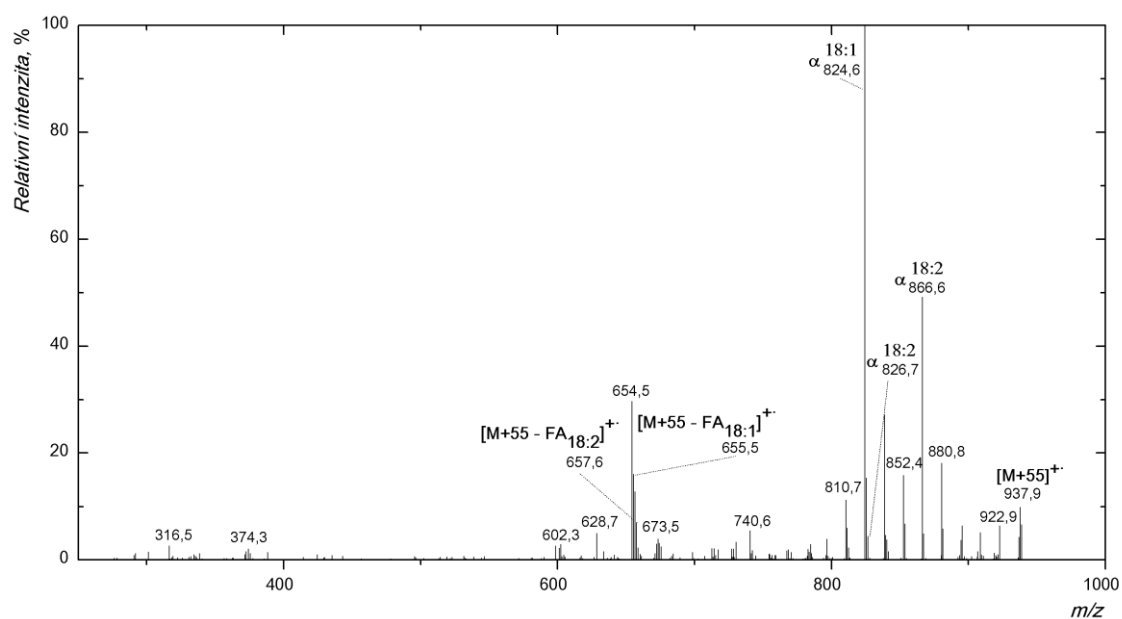
Číslo píku	t <sub>R</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+55] <sup>+-</sup>	TGs <sup>*</sup>	ECN
-	min	m/z	m/z	-	-
1	71,2	881,7	935,8	18:1(n-9) 18:2(n-6, 9) 18:2(n-6, 9)	44
2	71,6	855,6	909,8	16:1(n-7) 18:1(n-9) 18:2(n-6, 9)	44
3	72,0	881,7	935,6	18:1(n-9) 18:1(n-9) 18:3(n-3, 6, 9)	44
4	72,6	855,7	909,5	16:0 18:2(n-6, 9) 18:2(n-6, 9)	44
5	73,4	855,6	909,6	16:0 18:1(n-9) 18:3(n-3, 6, 9)	44
6	77,1	883,7	937,7	18:1(n-9) 18:1(n-9) 18:2(n-6, 9)	46
7	77,5	857,4	911,6	16:1(n-7) 18:1(n-9) 18:1(n-9)	46
8	78,5	857,5	911,6	16:0 18:1(n-9) 18:2(n-6, 9)	46
9	82,8	885,4	939,6	18:1(n-9) 18:1(n-9) 18:1(n-9)	48
10	84,3	859,4	913,5	16:0 18:1(n-9) 18:1(n-9)	48
11	87,9	913,5	967,7	18:1(n-9) 18:1(n-9) 20:1(n-9)	50
12	89,3	913,6	967,7	18:1(n-9) 18:2(n-6, 9) 20:0	50
13	89,7	887,5	941,8	16:0 18:1(n-9) 20:1(n-9)	50
14	89,9	887,4	941,7	18:0 18:1(n-9) 18:1(n-9)	50
15	94,5	915,4	969,7	18:1(n-9) 18:1(n-9) 20:0	52

\* Zapsané pořadí acylů nemusí odpovídat jejich uspořádání na glycerolu.

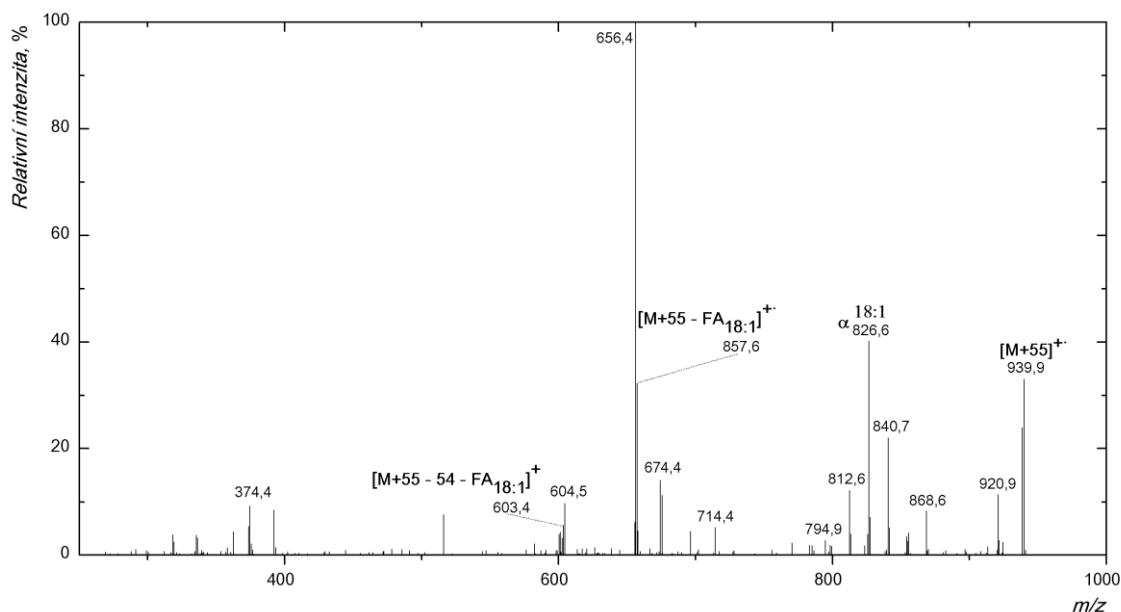
Důvodem proč nebyly identifikovány všechny TGs, bylo klesající množství acetonitrilu v gradientu mobilní fáze. Díky tomu klesala i intenzita molekulárního aduktu [M+55]<sup>+-</sup> v MS spektru. Intenzita iontu [M+H]<sup>+</sup>, který byl v daném píku nejintenzivnější, koreluje s intenzitou molekulárního aduktu [M+55]<sup>+-</sup>. Proto také u TGs, které byly zastoupené v malém množství, nebylo možno určit polohy jejich dvojných vazeb fragmentací molekulárního aduktu [M+55]<sup>+-</sup>. Na chromatogramu (Obr. 4.33, str. 51) je názorné, že se podařilo určit TGs, které byly zastoupené v největším množství. Identifikované píky jsou označené čísly. Fragmentační spektra na Obr. 4.34 (str. 51) a Obr. 4.35 (str. 52) charakterizují píky č. 6 a č. 9.



Obr. 4.33 Celkový „total ion current“ chromatogram olivového oleje (10,0 mg/ml). Experimentální podmínky jsou uvedeny v Tab. 3.1, Tab. 3.2, Tab. 3.3 a Tab. 3.4. Identifikované píky jsou označené čísly.



Obr. 4.34 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu TGs) pocházející z píku č. 6 identifikované jako 18:1(n-9)| 18:1(n-9)| 18:2(n-6, 9). Intenzita spektra je  $3,65 \cdot 10^1$  a.u..



Obr. 4.35 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu TGs pocházející z píku č. 9 identifikované jako 18:1(n-9)|18:1(n-9)|18:1(n-9). Intenzita spektra  $1,89 \cdot 10^1$  a.u..

#### 4.3.3 HPLC/APCI-MS<sup>2</sup> analýzy oleje z černého rybízu

Ve vzorku rybízového oleje byla určena poloha dvojné vazby u 48 TGs. Literatura uvádí, že tento olej může obsahovat až 80 různých TGs.<sup>41</sup> Seznam TGs identifikovaných touto metodou, je shrnut v Tab. 4.2.

Tab. 4.2 TGs identifikované ve vzorku rybízového oleje.

Číslo píku	$t_R$	$[M+H]^+$	$[M+55]^+$	TGs*	ECN
-	min	$m/z$	$m/z$	-	-
1	45,3	871,6	925,5	18:3(n-3, 6, 9) 18:3(n-3, 6, 9) 18:4(n-3, 6, 9, 12)	34
2	46,0	871,6	925,5	18:3(n- 6, 9, 12) 18:3(n-3, 6, 9) 18:4(n-3, 6, 9, 12)	34
3	49,9	873,7	927,5	18:3(n-3, 6, 9) 18:3(n-3, 6, 9) 18:3(n-3, 6, 9)	36
4	50,5	873,6	927,6	18:3(n-6, 9, 12) 18:3(n-3, 6, 9) 18:3(n-3, 6, 9)	36
5	51,4	873,6	927,6	18:3(n-3, 6, 9) 18:3(n- 6, 9,12) 18:3(n-6, 9, 12)	36
6	51,9	873,6	927,6	18:3(n-6, 9, 12)  18:3(n-6, 9, 12) 18:3(n-3, 6, 9)	36
7	52,3	873,6	927,6	18:2(n-6, 9) 18:3(n-6, 9, 12) 18:4(n-3, 6, 9, 12)	36
8	55,5	875,7	929,5	18:2(n-6, 9) 18:3(n-3, 6, 9) 18:3(n-3, 6, 9)	38
9	56,3	875,7	929,5	18:2(n-6, 9) 18:3(n-3, 6, 9) 18:3(n-6, 9, 12)	38
10	56,7	875,6	929,6	18:2(n-6, 9) 18:2(n-6, 9) 18:4(n-3, 6, 9, 12)	38
12	57,6	875,7	929,6	18:1(n-9) 18:3(n-3, 6, 9) 18:4(n-3, 6, 9, 12)	38
13	58,4	875,6	929,7	18:1(n-9) 18:3(n-6, 9, 12) 18:4(n-3, 6, 9, 12)	38
14	59,6	849,6	903,6	16:0 18:3(n-3, 6, 9)18:4(n-3, 6, 9, 12)	38
		849,6	903,6	16:0 18:3(n-6, 9, 12) 18:4(n-3, 6, 9, 12)	38
15	61,1	877,7	931,6	18:2(n-6, 9) 18:2(n-6, 9) 18:3(n-3, 6, 9)	40
16	61,9	877,7	931,6	18:2(n-6, 9) 18:2(n-6, 9) 18:3(n-6, 9, 12)	40
		877,7	931,6	18:1(n-9) 18:3(n-3, 6, 9) 18:3(n-3, 6, 9)	40
17	62,9	877,6	931,6	18:1(n-9) 18:3(n-3, 6, 9) 18:3(n-6, 9, 12)	40
18	63,6	877,6	931,6	18:1(n-9) 18:2(n-6, 9) 18:4(n-3, 6, 9, 12)	40

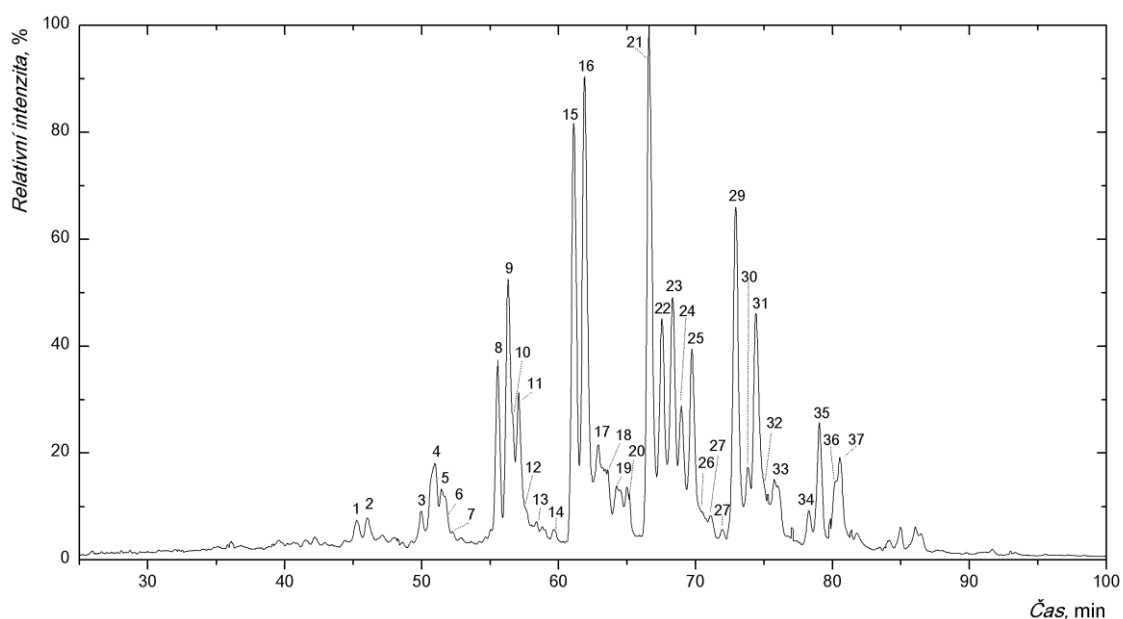


Číslo píku	t <sub>R</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+55] <sup>+</sup>	TGs*	ECN
-	min	m/z	m/z	-	-
19	64,2	851,6	905,6	16:0 18:3(n-3, 6, 9) 18:3(n-3, 6, 9)	40
20	65,2	851,6	905,6	16:0 18:3(n-6, 9, 12) 18:3(n-3, 6, 9)	40
		851,6	905,6	16:0 18:2(n-6, 9) 18:4(n-3, 6, 9, 12)	40
		851,6	905,6	16:0 18:3(n-6, 9, 12) 18:3(n-6, 9, 12)	40
		877,6	931,6	18:0 18:3(n-3, 6, 9) 18:4(n-3, 6, 9, 12)	40
21	66,6	879,7	933,6	18:2(n-6, 9) 18:2(n-6, 9) 18:2(n-6, 9)	42
22	67,5	879,7	933,6	18:1(n-9) 18:2(n-6, 9) 18:3(n-3, 6, 9)	42
23	68,3	879,7	933,6	18:1(n-9) 18:2(n-6, 9) 18:3(n-6, 9, 12)	42
24	68,9	853,6	907,6	16:0 18:2(n-6, 9) 18:3(n-3, 6, 9)	42
25	69,7	853,6	907,6	16:0 18:2(n-6, 9) 18:3(n-6, 9, 12)	42
26	70,5	879,6	933,6	18:0 18:2(n-6, 9) 18:4(n-3, 6, 9, 12)	42
		879,6	933,6	18:0 18:3(n-3, 6, 9) 18:3(n-6, 9, 12)	42
		853,6	907,7	16:0 18:1(n-9) 18:4(n-3, 6, 9, 12)	42
27	71,2	879,6	933,6	18:0 18:3(n-6, 9, 12) 18:3(n-6, 9, 12)	42
28	72,0	907,6	961,6	18:2(n-6, 9) 18:2(n-6, 9) 20:2(n-6, 9)	44
29	72,9	881,7	935,7	18:1(n-9) 18:2(n-6, 9) 18:2(n-6, 9)	44
		907,6	961,6	18:2(n-6, 9) 18:3(n-3, 6, 9) 20:1(n-9)	44
30	73,8	881,7	935,7	18:1(n-9) 18:1(n-9) 18:3(n-3, 6, 9)	44
		907,6	961,7	18:2(n-6, 9) 18:3(n-6, 9, 12) 20:1(n-9)	44
31	74,4	855,6	909,6	16:0 18:2(n-6, 9) 18:2(n-6, 9)	44
		881,7	935,6	18:1(n-9) 18:1(n-9) 18:3(n-6, 9, 12)	44
32	74,8	881,6	935,7	18:0 18:2(n-6, 9) 18:3(n-3, 6, 9)	44
		855,7	909,7	16:0 18:1(n-9) 18:3(n-3, 6, 9)	44
33	75,8	881,7	935,7	18:0 18:2(n-6, 9) 18:3(n-6, 9, 12)	44
34	78,3	909,7	963,7	18:2(n-6, 9) 18:2(n-6, 9) 20:1(n-9)	46
35	79,1	883,7	932,7	18:1(n-9) 18:1(n-9) 18:2(n-6, 9)	46
36	80,2	883,7	937,7	18:0 18:2(n-6, 9) 18:2(n-6, 9)	46
37	80,6	857,5	911,7	16:0 18:1(n-9) 18:2(n-6, 9)	46

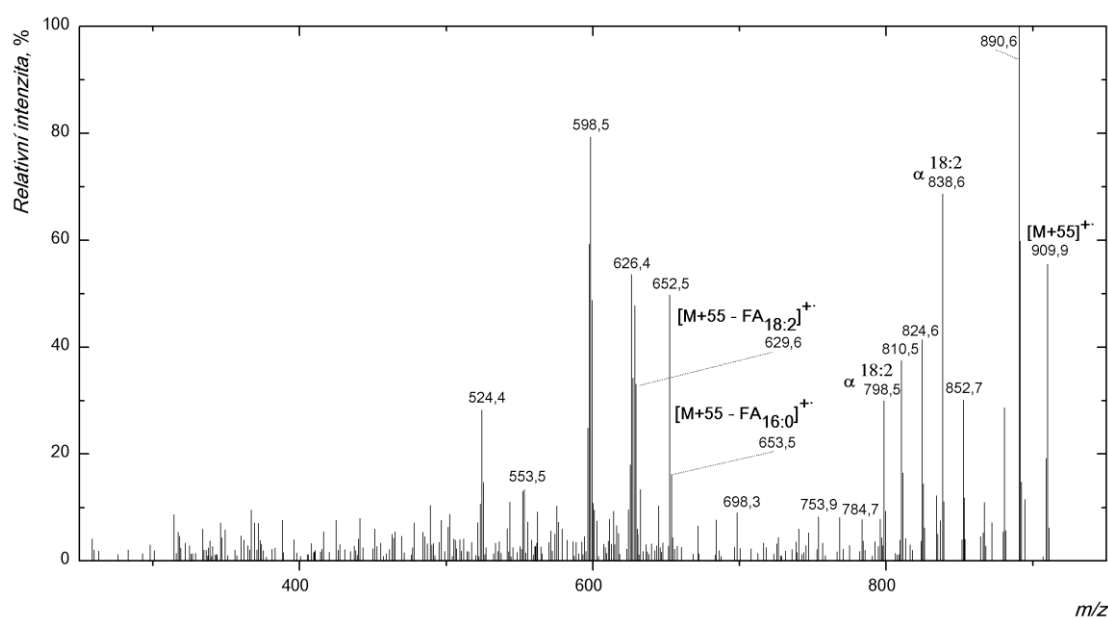
\*Zapsané pořadí acylů nemusí odpovídat jejich uspořádání na glycerolu.

Separace TGs začínala již okolo 40. minuty, kdy podíl acetonitrilu v gradientu mobilní fáze byl relativně velký. Proto bylo možné určit i TGs v minoritním zastoupení, kdy intenzita iontu [M+H]<sup>+</sup> byla poměrně nízká, ale díky převládajícímu množství acetonitrilu v mobilní fázi se některé z těchto TGs podařilo identifikovat.

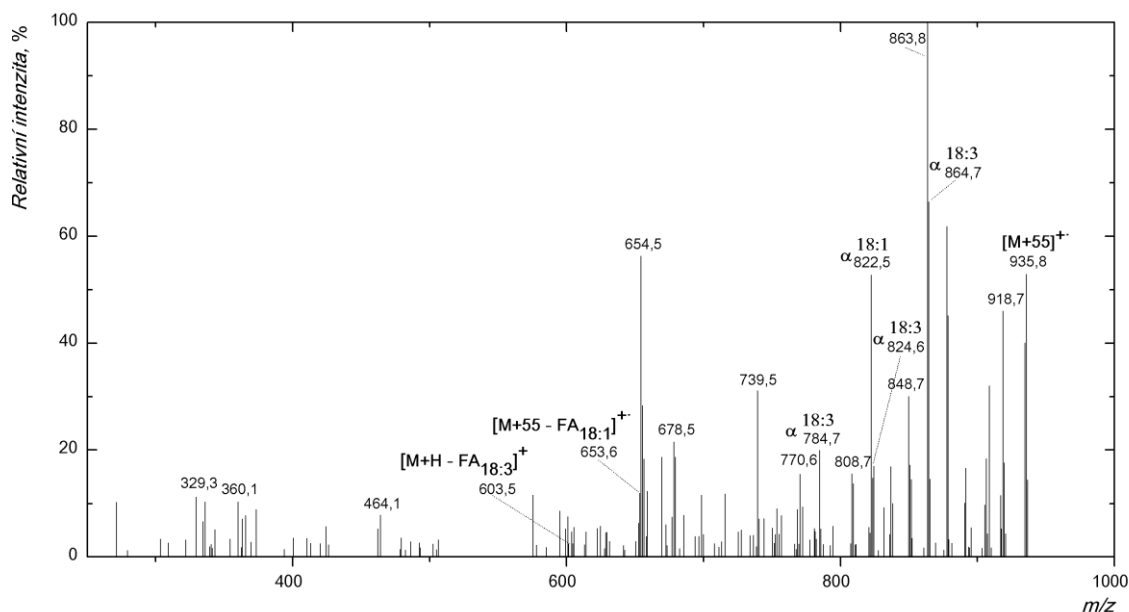
Chromatogram oleje z černého rybízu je zobrazen na Obr. 4.36 (str. 54). Z chromatogramu je vidět, že tento materiál je již komplexnější než olivový olej. Dochází ke koeluci píků s možností výskytu TGs o stejné i různé hmotnosti. Fragmentační spektra aduktů [M+55]<sup>+</sup>, která jsou na Obr. 4.37 (str. 54) a Obr. 4.38 (str. 55), pocházejí z píku 31.



Obr. 4.36 Celkový „total ion current“ chromatogram rybízového oleje (10,0 mg/ml). Experimentální podmínky jsou uvedeny v Tab. 3.1, Tab. 3.2, Tab. 3.3 a Tab. 3.4. Identifikované píky jsou označeny čísly.



Obr. 4.37 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu TG pocházející z píku č. 31 identifikované jako 18:2(n-6, 9)|18:2(n-6, 9)|16:0). Intenzita spektra je 9,92 a.u..



Obr. 4.38 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu TG pocházející z píku č. 31 identifikované jako 18:1(n-9)|18:1(n-9)|18:3(n-6, 9, 12). Intenzita spektra je 8,46 a.u..

#### 4.3.4 HPLC/APCI-MS<sup>2</sup> analýza novorozeneckého mázku

Ze vzorku nenasycených TGs (1,8 mg/ml) se podařilo určit 13 TGs. Jejich identifikace však nebyla zcela jednoznačná, jelikož intenzita spektra byla nízká. Pravděpodobně koelulovalo i více TGs o stejné hmotnosti v jednom píku. Proto je uvedeno několik možností TGs, které by mohly odpovídat naměřeným spektrům. U dalších 11 TGs se povedlo získat fragmentační spektrum aduktu  $[M+55]^+$ , ale s přibývajícím zastoupením propan-2-olu v mobilní fázi klesala i intenzita a kvalita spektra. Z fragmentů, které charakterizují dvojnou vazbu, nebylo možné určit, o jaký TG se jedná. Tab. 4.3 shrnuje jaké TGs se ve vzorku nachází.

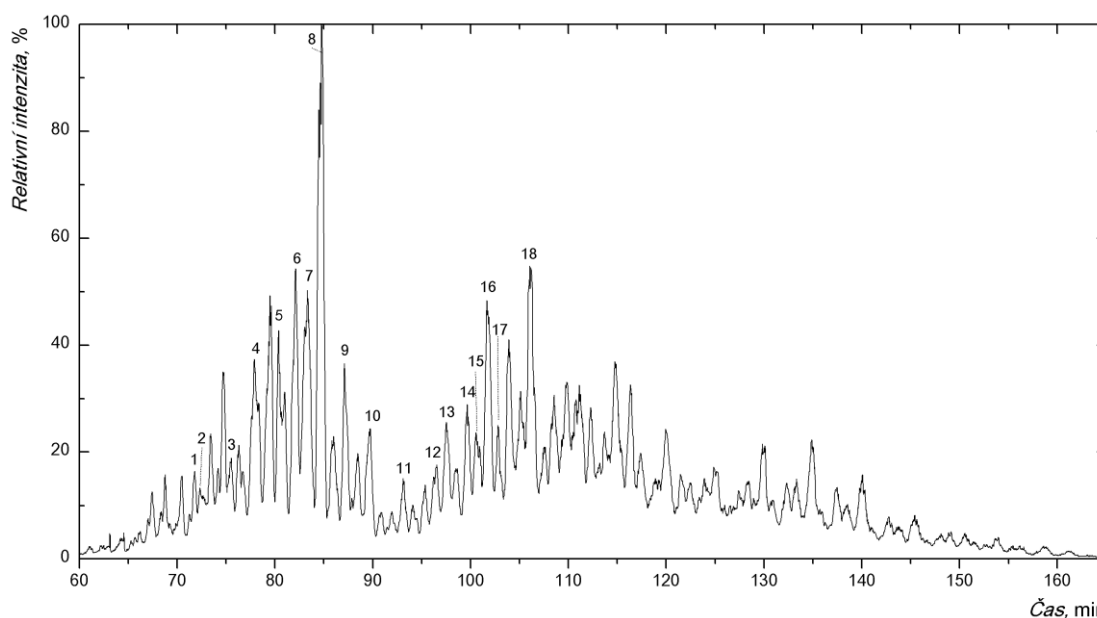
Tab. 4.3 TGs identifikované ve vzorku VC.

Číslo píku	$t_R$	$[M+H]^+$	$[M+55]^+$	TGs*	ECN
-	min	m/z	m/z	-	-
1	71,9	763,8	817,8	13:0 16:0 16:1(n-10)	43
				13:0 14:0 18:1(n-9)	43
2	72,3	777,6	831,6	14:0 14:0 18:1(n-7)	44
		803,4	857,5	16:0 16:1(n-9) 16:1(n-9)	44
				16:0 16:1(n-8) 16:1(n-8)	44
				16:0 16:1(n-5) 16:1(n-5)	44
3	75,5	791,6	845,6	14:0 16:1(n-10) 17:0	45
				14:0 15:0 18:1(n-8)	45
4	77,9	805,6	859,6	14:1(n-8) 16:0 18:0	46
		831,4	885,6	14:1(n-10) 18:0 18:1(n-7)	46
5	80,4	819,5	873,6	15:0 16:0 18:1(n-7)	47
				15:0 16:0 18:1(n-9)	47
		845,5	899,6	16:1(n-8) 17:0 18:1(n-5)	47

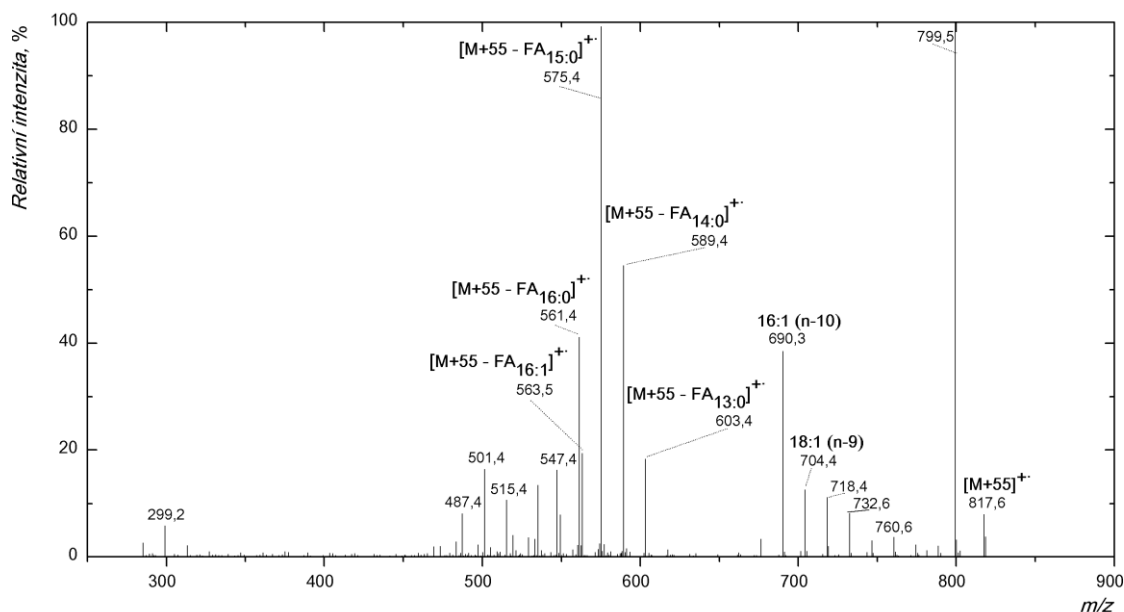
Číslo píku	t <sub>R</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+55] <sup>+-</sup>	TGs*	ECN
-	min	m/z	m/z	-	-
6	82,1	819,5	873,5	14:1(n-10) 16:0 19:0	47
		833,5	887,6	16:0 16:1(n-9) 18:0	48
7	83,4	859,5	913,7	16:1(n-7) 18:0 18:1(n-9)	48
8	84,7	833,1	887,4	16:0 16:0 18:1(n-9)	48
				14:0 18:0 18:1(n-9)	48
9	87,1	847,3	901,5	?	-
10	89,8	861,6	915,7	?	-
11	93,1	889,4	943,8	?	-
12	96,5	875,6	929,5	?	-
		917,5	971,6	?	-
13	97,5	943,4	997,7	?	-
		957,3	1011,5	?	-
14	99,6	971,4	1025,6	?	-
15	100,7	945,6	999,5	?	-
16	101,6	959,7	1013,5	?	-
17	102,8	888,5	1053,3	?	-
18	106,2	973,6	1027,5	14:0 16:0 30:1(n-9)	58

\* Zapsané pořadí acylů nemusí odpovídat jejich uspořádání na glycerolu.

Z chromatogramu na Obr. 4.39 je patrné, že VC je velice komplexní materiál. Fragmentační spektra pocházejí ze dvou různých analýz. Na Obr. 4.40 a Obr. 4.41 (str. 57) jsou fragmentační spektra vzniklé fragmentací zvolených prekurzorů. Po porovnání s Obr. 4.42 (str. 58) je vidět, že tato spektra jsou mnohem kvalitnější, mají vyšší intenzitu a jde z nich lépe určit struktura daného TG.

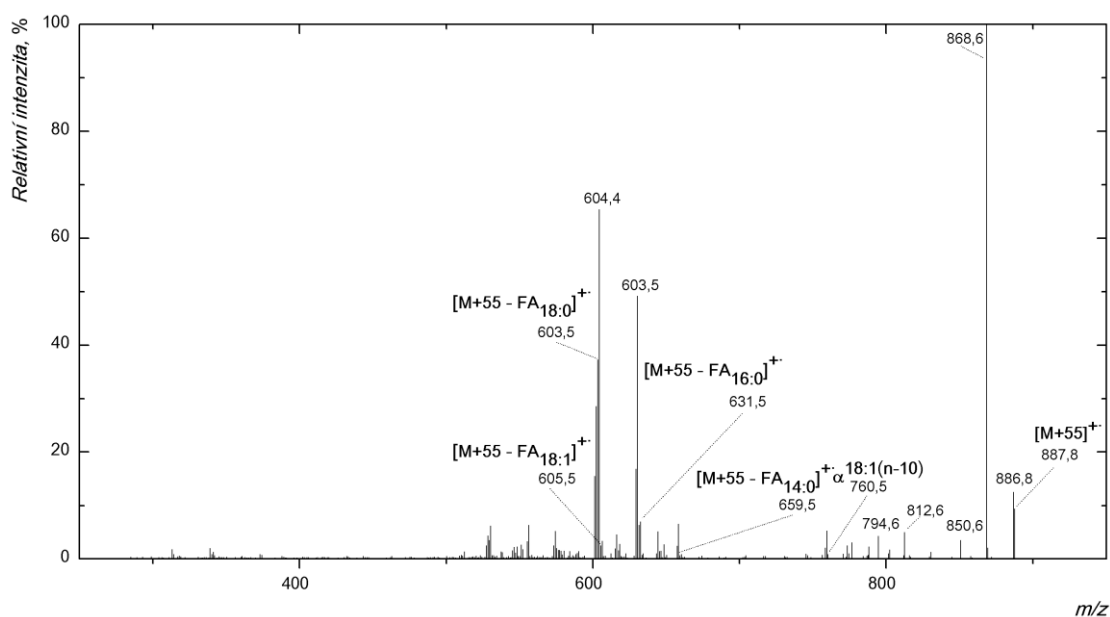


Obr. 4.39 „Base peak“ chromatogram TG izolovaných z VC (10,0 mg/ml). Experimentální podmínky jsou uvedeny v Tab. 3.1, Tab. 3.2 a Tab. 3.6. Identifikované píky jsou označené čísly.

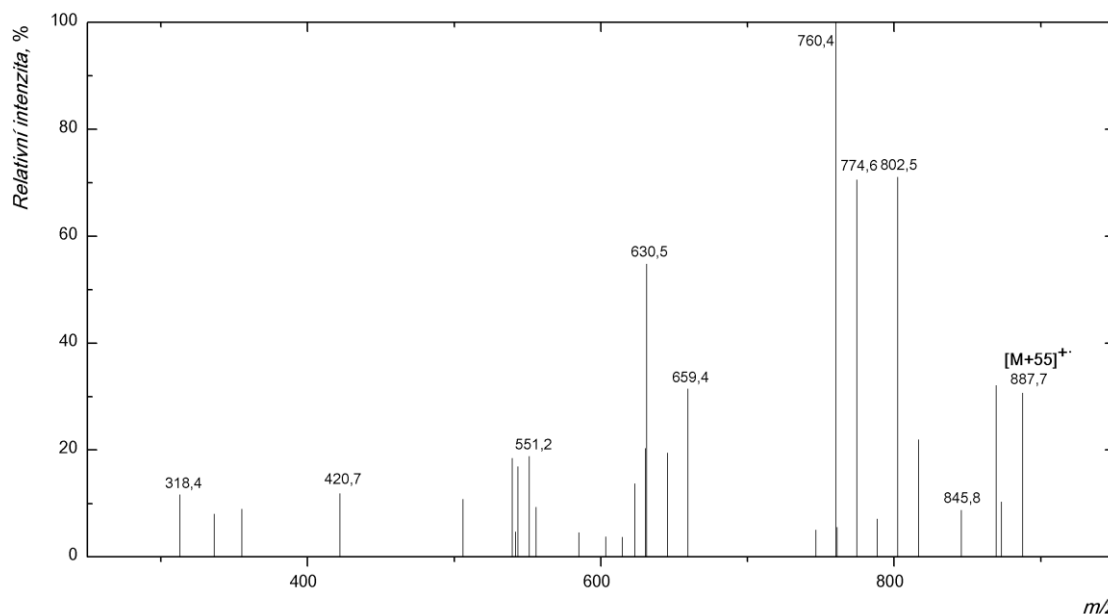


Obr. 4.40 APCI-MS/MS spektrum (CID) vzniklé fragmentací zvolených prekurzorů ( $m/z$  817,6). Spektrum pocházející z píku č. 1 bylo interpretováno jako směs 13:0|16:0|16:1(n-10) nebo 13:0|14:0|18:1(n-9). Intenzita spektra je  $1,24 \cdot 10^1$  a.u..

Fragmentační spektrum na Obr. 4.40 pochází z píku č. 1. Standardní analýza data dependentní fragmentací prekurzorů nezaznamenala žádné fragmentační spektrum molekulárního aduktu [M+55]<sup>+</sup>.



Obr. 4.41 APCI-MS/MS spektrum (CID) vzniklé fragmentací zvolených prekurzorů ( $m/z$  887,8) Spektrum pocházející z píku č. 8 bylo interpretováno jako směs 16:0|16:0|18:1(n-9) nebo 14:0|18:0|18:1(n-9). Intenzita spektra je  $1,54 \cdot 10^1$  a.u..



Obr. 4.42 APCI-MS/MS spektrum (CID) data-dependentní fragmentace prekurzorů aduktu TG pocházející z píku č. 8. Intenzita spektra je 2,30 a.u..

Z porovnání fragmentačních spekter pocházejících z píku č. 8 na Obr. 4.41 a Obr. 4.42 je patrné, že při použití data dependentní fragmentace prekurzorů, je možné s obtížemi určit pozici dvojně vazby v TG. Spektrum vzniklé fragmentací zvoleného prekurzoru ( $m/z$  887,8) má vyšší intenzitu a identifikace TGs je tak jednoznačnější.

## 5 Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na lokalizaci dvojných vazeb v TGs. Pro analýzu bylo použito 14 komerčních standardů, z nichž byly randomizační syntézou vyrobeny další TGs. Randomizačními reakcemi v mikroměřítku se podařilo připravit 44 kombinací TGs, jež se lišily v poloze i počtem dvojných vazeb a také délkou uhlovodíkového řetězce. Výsledkem této reakce byla směs izomerních TGs. Nespornou výhodou provádění této reakce v mikroměřítku je menší spotřeba reakčních standardů i dalších používaných chemikálií.

Vyvinutá metoda pro určování poloh dvojných vazeb využívá tvorby acetonitrilového aduktu  $[C_3H_5N]^+$  v iontovém zdroji pro APCI. Analýzou komerčně dostupných standardů a připravených směsí bylo zjištěno, že je tato metoda použitelná pro mononenasyčené i polynenasycené TGs. Měření bylo prováděno na hmotnostním spektrometru se sférickou iontovou pastí. Detekce iontů v nízké oblasti hodnot  $m/z$  byla možná díky PQD fragmentaci. Citlivost detekce fragmentů však byla výrazně nižší než při použití CID. Ve fragmentačních spektrech aduktů  $[M+55]^+$  byly přítomny  $\alpha$  a  $\beta$  ionty, které jsou určující pro lokalizaci dvojných vazeb. Pokud by pro měření použit např. tandemový hybridní hmotnostní spektrometr s kvadrupólem a ortogonálním průletovým hmotnostním analyzátozem (Q-TOF) nebo s trojitým kvadrupólem (QqQ), bylo by možné vidět i ionty o nízkém  $m/z$  ve fragmentačním spektru.

Po optimalizaci metody na komerčně dostupných standardech i randomizačních směsích následovala separace přírodních směsí pomocí HPLC na koloně Nova-Pack<sup>®</sup> C<sub>18</sub>. Analýza olivového oleje ukázala, že lze touto metodou určit 15 různých TGs. Dalším rostlinným vzorkem byl olej z černého rybízu, z něhož bylo identifikováno 48 TGs. Jednalo se však již o komplexnější materiál. Posledním a nejsložitějším vzorkem pro HPLC separaci byl vzorek VC. Z výsledků je patrné, že bylo identifikováno 13 TGs. V této přírodní směsi se majoritně vyskytují rozvětvené FAs, avšak vyvinutou metodou nelze určit, zda-li navázané acyly jsou rozvětvené či lineární. Klesající intenzita  $[M+55]^+$  s postupným zvyšujícím se množstvím propan-2-olu v mobilní fázi by se dala vyřešit postkolonovým přidáváním acetonitrilu, popřípadě použitím kratší kolony, aby separace vzorku začínala již v prvních minutách analýzy. Nevýhodou by však bylo horší rozdělení přírodních směsí.

Předností metody pro lokalizaci dvojných vazeb u TGs, která využívá tvorby acetonitrilových aduktů, je možnost spojení s HPLC. Výhodou je také možnost použití intaktních TGs. Úskalí této metody spočívá v občas poměrně malé intenzitě aduktu  $C_3H_5N^+$ . Během studia TGs touto metodou proběhla řada nepříliš úspěšných pokusů zvýšení intenzity signálu molekulárního aduktu  $[M+55]^+$ . Hlavním nedostatkem je dosavadní neznalost struktury a mechanismu vzniku tohoto aduktu.

## 6 Soupis bibliografických citací

- 1 Cyberlipid center: *Description of the various lipids*. Dostupné z URL: <<http://www.cyberlipid.org/cyberlip/desc0004.htm#top>> [cit. 10.4.2013]
- 2 Wenk, M., R.: The emerging field of lipidomics. *Nat. Rev. Drug Discovery* **4**:7, 594-610 (2005).
- 3 Zehethofer, N.; Pinto, D., M.: Recent developments in tandem mass spectrometry for lipidomic analysis. *Anal. Chim. Acta* **627**:1, 62-67 (2008).
- 4 Shui, G.: System level analysis of lipidome. *Front. Biol.* **6**:3, 183-189 (2011).
- 5 Christie, W., W.: Lipidomics – a personal view. *Lipid Technol.* **21**:3, 58-60 (2009).
- 6 Laakso, P.: Mass spectrometry of triacylglycerols. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **104**:1, 43 -49 (2002).
- 7 Food and Agriculture Organization of the United Nations: *Aspects of fat digestion and metabolism*. Dostupné z URL: <<http://www.fao.org/docrep/V4700E/V4700E08.htm>> [cit. 10.4.2013]
- 8 Mitchell, T., W.; Pham, H.; Thomas, M., C.; Blanksby., S., J.: Identification of double bond position in lipids: from GC to OzID. *J. Chromatogr., B* **877**:26, 2722-2735 (2009).
- 9 Vrkoslav, V.; Háková, M.; Pecková, K.; Urbanová, K.; Cvačka, J.: Localization of double bonds in wax esters by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry utilizing the fragmentation of acetonitrile-related adducts. *Anal. Chem.* **83**:8, 2978-2986 (2011).
- 10 Fahy, E.; Subramaniam, S.; Brown, A.; Glass, Ch., K.; Merrill, A., H.; Murphy, R., C.; Raetz, C., R., H.; Russell, D., W.; Seyama, Y.; Shaw, W.; Shimizu, T.; Spener, F.; van Meer, G.; VanNieuwenhze, M., S.; White, S., H; Witztum, J., L.; Dennis, E., A.: A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* **46**:5, 839-861 (2005).
- 11 McMurry, J.: *Organická chemie*. Brno, Vitium 2007.
- 12 Astarita, G.; Yu, K.: New frontiers for mass spectrometry in lipidomics (part 1). *LC·GC Eur.* **25**:3, 154-158 (2012).
- 13 AOCS Lipid Library: *Lipid chemistry, biology, technology & analysis*. Dostupné z URL: <<http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/whatlip/index.htm>> [cit. 7.1.2013]
- 14 Cyberlipid Center: *Resource site for lipid studies*. Dostupné z URL: <<http://www.cyberlipid.org/cyberlip/home0001.htm>> [cit. 7.1.2013]
- 15 Voet, D.: *Biochemie*. Praha, Victoria, Publishing 1995.
- 16 Koolman, J.; Röhm, K., H.: *Barevný atlas biochemie*. Praha, Grada 2012.
- 17 Garrett, R., H.; Grisham, C., M.: *Biochemistry*. 4th ed. Boston, Brooks/Cole 2010.
- 18 AOCS Lipid Library: *Structural analysis of triacylglycerols*. Dostupné z URL: <<http://lipidlibrary.aocs.org/topics/taganal/index.htm>> [cit. 7.1.2013]
- 19 Eastmond, P., J.: *Triacylglycerol mobilisation in plants*. Dostupné z URL: <[http://lipidlibrary.aocs.org/plantbio/tag\\_mobilisation/index.htm](http://lipidlibrary.aocs.org/plantbio/tag_mobilisation/index.htm)> [cit. 22.2.2013]
- 20 Hou, W.; Zou, H.; Elisma, F.; Bennett, S., A., L.; Figeys, D.: Technological developments in lipidomics. *Briefings Funct. Genomics Proteomics* **7**:5, 395-409 (2008).



- 21 Murphy, R. C.; Fiedler, J.; Hevko, J.: Analysis of nonvolatile lipids by mass spectrometry. *Chem. Rev.* **101**:2, 479 – 526 (2001).
- 22 Griffiths, W. J.: Tandem mass spectrometry in the study of fatty acids, bile acids, and steroids. *Mass Spectrom. Rev.* **22**:2, 81-152 (2003).
- 23 Astarita, G.; Yu, K.: New frontiers for MS in lipidomics (part 2). *LC-GC Eur.* **25**:6, 324-334 (2012).
- 24 Gross, J., H.: *Mass Spectrometry*. Berlin, Springer 2004.
- 25 Xu, Y.; Brenna, T.: Atmospheric pressure covalent adduct chemical ionization tandem mass spectrometry for double bond localization in monoene- and diene-containing triacylglycerols. *Anal. Chem.* **79**:6, 2525-2536 (2007).
- 26 Hsu, F., F.; Turk, J.: Structural characterization of triacylglycerols as lithiated adducts by electrospray ionization mass spectrometry using low-energy collisionally activated dissociation on a triple stage quadrupole instrument. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**:7, 587-599 (1999).
- 27 Byrdwell, W., C.: *Modern Methods for Lipid Analysis*. Champaign, AOCS Press 2005.
- 28 Byrdwell, W., C.: Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Lipids* **36**:4, 327 (2001).
- 29 Masonaco – Mass Spectrometry of Natural Compounds. *Electrospray (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI)*. Dostupné z URL: <<https://sites.google.com/site/masonaco/Home/mass-spectrometry/sample-introduction-and-ionization/esi-apci>> [cit. 28.1.2013]
- 30 Thermo Scientific: *LCQ Fleet, Hardware Manual* [CD-ROM]
- 31 Moneti, G.; Pieraccini, G.; Dani, F., R.; Catinella, S.; Traldi, P.: Acetonitrile as an effective reactant species for positive-ion chemical ionization of hydrocarbons by ion-trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**:2, 167-170 (1996).
- 32 Moneti, G.; Pieraccini, G.; Dani, F., R.; Turillazzi, S.; Favretto, D.; Traldi, P.: Ion-molecule reactions of ionic species from acetonitrile with unsaturated hydrocarbons for identification of the double-bond position using an ion trap. *J. Mass Spectrom.* **32**:2, 1371-1373 (1997).
- 33 Oldham, J., N.: Ion/molecule reactions provide new evidence for the structure and origin of  $[C_3H_4N]^+$  from acetonitrile chemical ionization plasma. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**:16, 1694-1698 (1999).
- 34 Moneti, G.; Pieraccini, G.; Favretto, D.; Traldi, P.: Acetonitrile in chemical ionization of monounsaturated hydrocarbons: a  $^{12}C$  and  $^2H$  labeling study. *J. Mass Spectrom.* **33**:1, 1148-1149 (1998).
- 35 Lawrence, P.; Brenna, T.: Acetonitrile covalent adduct chemical ionization mass spectrometry for double bond localization in non-methylene-interrupted polyene fatty acid methyl esters. *Anal. Chem.* **78**:4, 1312-1317 (2006)
- 36 Vrkoslav, V.; Cvačka, J.: Identification of the double-bond position in fatty acid methylesters by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* **1259**, 244-250 (2012).
- 37 March, R., E.: Quadrupole Ion Trap. *Mass Spectrom. Rev.* **28**:6, 961-989 (2009).

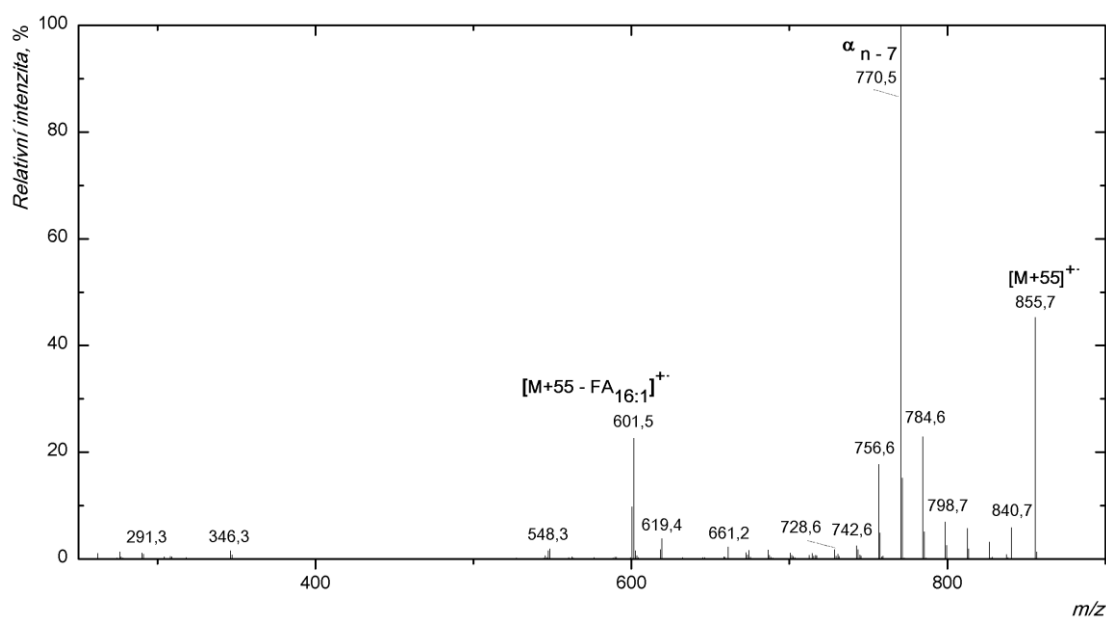
- 38 Thermo Scientific: *Pulsed Q Collision Induced Dissociation (PQD) on Linear Ion Trap Mass Spectrometers*. Dostupné z URL:  
<[http://sjsupport.thermofinnigan.com/marketing/manuals/PSB124\\_62578.pdf](http://sjsupport.thermofinnigan.com/marketing/manuals/PSB124_62578.pdf)>  
[cit. 10.4.2013]
- 39 Nie, H.; Liu, R.; Yang, Y.; Bai, Y.; Guan, Y.; Qian, D.; Wang, T.; Liu, H.: Lipid profiling of rat peritoneal surface layers by online normal- and reversed-phase 2D LC QToF-MS. *J. Lipid Res.* **51**:9, 2833-2844 (2010).
- 40 Hutchins, P., M.; Barkley, R., M.; Murphy, R., C.: Separation of cellular nonpolar neutral lipids by normal-phase chromatography and analysis by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Lipid Res.* **49**:4, 804 -813 (2008).
- 41 Líba, M.; Holčapek, M.; Boháč, M.: Statistical evaluation of triacylglycerol composition in plant oils based on high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry data. *J. Agric. Food Chem.* **57**:15, 6888-6898 (2009).
- 42 Perona, J., S.; Ruiz-Gutierrez, V.: *Handbook of Food Analysis*. 2th ed. New York, CRC Press 2004.
- 43 Aselsen, P., H.; Murphy, R., C.: Quantitative analysis of phospholipids containing arachidonate and docosahexaenoate chains in microdissected regions of mouse brain. *J. Lipid Res.* **51**:3, 660-671 (2010).
- 44 Laakso, P.; Manninen, P.: Identification of milk fat triacylglycerols by capillary supercritical fluid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Lipids* **32**:12, 1285-1295 (1997).
- 45 Ruiz-Samblás, C.; González-Casado, A.; Cuadros-Rodríguez, L.; Rodríguez García, F., P.: Application of selected ion monitoring to the analysis of triacylglycerols in olive oil by high temperature-gas chromatography/mass spectrometry. *Talanta* **82**:1, 255 (2010).
- 46 Filho, N., R., A.; Carrilho, E.; Lancas, F., M.: Fast quantitative analysis of soybean oil in olive oil by high-temperature capillary gas chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**:10, 1051-1053 (1993).
- 47 Eder, K.: Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *J. Chromatogr., B* **671**:1+2, 113-131 (1995).
- 48 Christie, W., W.; Han, X.: *Lipid analysis: Isolation, separation, identification and lipidomic analysis*. 4th ed. Washington, Oily Press 2010.
- 49 Shantha, N., C.; Napolitano, G., E.: Gas chromatography of fatty acids. *J. Chromatogr., A* **624**:1-2, 97-51 (1992).
- 50 Cheng, C.; Gross, M., L.: Complete Structural elucidation of triacylglycerols by tandem sector mass spectrometry. *Anal. Chem.* **70**:4, 4417 (1998).
- 51 Adams, J.; Gross, M., L.: Charge-remote fragmentations of closed-shell ions. A thermolytic analogy. *J. Am. Chem. Soc.* **111**:2, 435-440 (1989).
- 52 Kubo, A.; Satoh, T.; Itoh, Y.; Hashimoto, M.; Tamura, J.; Cody, R., B.: Structural analysis of triacylglycerols by using a MALDI-TOF/TOF system with monoisotopic precursor selection. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* December (2012).
- 53 Thomas, M. C.; Mitchell, T., W.; Harman, D., G.; Deeley, J., M.; Nealon, J., R.; Blanksby, S., J.: Ozone-induced dissociation: elucidation of double bonds position within mass-selected lipid ions. *Anal. Chem* **80**:1, 303-311 (2008).

- 54 Hoath, S.; Pickens, W.: *Neonatal Skin: Structure and Function*. 2th ed. New York: Marcel Dekker 2003.
- 55 Gurcharan, S.; Archana, G: Unraveling the mystery of vernix caseosa. *Indian J. Dermatol. Venereol.* **53**:2, 54-60 (2008).
- 56 Rissmann, R.; Groenink, H., W., W.; Meerheim, A., M.; Hoath, S., B.; Ponec, M.; Bouwstra, J., A.: New Insights into Ultrastructure, Lipid Composition and Organization of Vernix Caseosa. *J. Invest. Dermatol.* **126**:8, 1823-1833 (2006).
- 57 Hoeger, P., H.; Schreiner, V.; Klaassen, I., A.; Enzmann, C., C.; Friedrichs, K.; Bleck, O.: Epidermal barrier lipids in human vernix caseosa: corresponding ceramide pattern in vernix and fetal skin. *Br. J. Dermatol.* **146**:2, 194-201 (2002).
- 58 Pickens, W.; Warner, R.; Boissy, R.; et al.: Characterization of vernix: water content morphology and elemental analysis. *J. Invest. Dermatol.* **115**:5, 875-881 (2000).
- 59 Ankinbi, H., T.; Narendran, V.; Pass, K., A; Markart, P.; Hoath, S.: Host defense proteins in vernix caseosa and amniotic fluid. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **191**:6, 2090-2096 (2004).
- 60 Rissmann, R.; Oudshoorn, M., H., M.; Zwier, R.; Ponec, M.; Bouwstra, J. A.; Hennink W., E.: Mimicking vernix caseosa – Preparation and characterization of synthetic biofilms. *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)* **372**:1-2, 59-65 (2009).
- 61 Schmid, R.: Notizen zur Kenntnis der Vernix caseosa. *Arch. Gynecol. Obstet.* **168**:2, 445-450 (1939).
- 62 Rissmann, R.; Oudshoorn, M., H., M.; Kocks, E.; Hennik, W., E.; Ponec, M.; Bouwstra, J., A.: Lanolin-derived lipid mixtures mimic closely the lipid composition and organization of vernix caseosa lipids. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1778**:10, 2350-2360 (2008).
- 63 Hauff, S.; Vetter, W.: Exploring the fatty acids of vernix caseosa in form of their methyl esters by off-line coupling of non-aqueous reversed phase high performance liquid chromatography and gas chromatography coupled to mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* **1217**:52, 8270-8278 (2010).
- 64 Kärkkäinen, J.; Nikkari, J.; Ruponen, S.; Haahti, E.: Lipids of vernix caseosa. *J. Invest. Dermatol.* **44**, 333-338 (1965).
- 65 Lipid Library: *Fatty acids: Branched-chain*. Dostupné z URL: <[http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/fa\\_branc/index.htm](http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/fa_branc/index.htm)> [cit. 10.4.2013]
- 66 Hoath, S., B.; Pickens, W., L.; Visscher, M., O.: The biology of vernix caseosa. *Int. J. Cosmet. Sci.* **28**:5, 319-33 (2006).
- 67 Tollin, M.; Bergsson, G.; Kai-Larsen, Y.; et al.: Vernix caseosa as a multi-component defence system based on polypeptides, lipids and their interactions. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**:19-20, 2390-2399(2005).
- 68 Akinbi, H. T.; Narendran, V.; Pass, A., K.; Markart, P., Hoath., S., B.: Host defense proteins in vernix caseosa and amniotic fluid. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **191**:6, 2090-2096 (2004).
- 69 Visscher, M., O.; Utturkar, R.; Pickens, W., L.; LaRuffa, A., A.; Robinson, M.; Wickett, R., R.; Narendran, V.; Hoath, S., B.: Neonatal skin maturation – vernix caseosa and free amino acids. *Pediatr Dermatol.* **28**:2, 122-132 (2011).
- 70 Baker, S., M.; Balo, N., N.; Abdel, A.: Is vernix caseosa a protective material to the newborn? A biochemical approach. *Indian J. Pediatr.* **62**:2, 237-239 (1995).

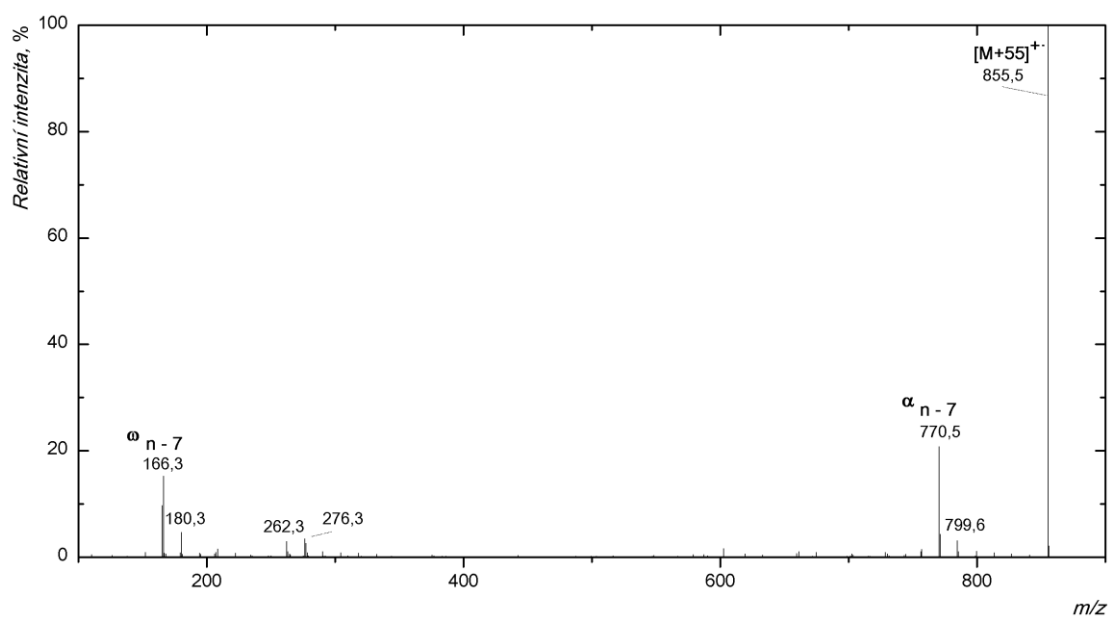
- 71 Morailli, R.; Pickens, W., L.; Visscher, M., O.; Hoath, S., B.: A novel role for vernix caseosa as a skin cleanser. *Biol. Neonate* **87**:1, 8-14 (2004).
- 72 Visscher, M., O.; Narendran, V.; Pickens, W., L.; LaRuffa, A., A.; Meinzen-Derr, J.; Allen, K.; *et al.*: Vernix caseosa in neonatal adaptation. *J. Perinatol.* **25**:7, 440-446 (2005).
- 73 Yoshio, H.; Tollin, M.; Gudmundsson, G., H.; Lagercrantz, H.; Jornvall, H.; Marchini, G.; Agerberth, B.: Antimicrobial polypeptides of human vernix caseosa and amniotic fluid: implications for newborn innate defense. *Pediatr. Res.* **53**:2, 211-216 (2003).
- 74 Leifer, G.: *Úvod do porodnického a pediatrického ošetřovatelství*, Praha, Grada 2004.
- 75 O'Grady, J., P.; Prefontaine, M.; Hoffman, D., E.: Vernixuria: another sign of uterine rupture. *J Perinatol.* **23**:4, 351-352 (2003).
- 76 Cummings, B.; Scarth, H.; Tran, H., T.; Walley, V., M.; Vernix caseosa peritonitis presenting post partum as acute cholecystitis. *Can. J. Surg.* **44**:4, 298-300 (2001).
- 77 Boothby, R.; Lammert, N.; Benrubi, G., I.; Wiess, B.: Vernix caseosa granuloma: A rare complication of cesarean section. *South. Med. J.* **78**:11, 1395-1996 (1985).
- 78 Nishijima, K.; Shukunami, K.; Inoue, S.; Kotsuji, F.: Management for neonatal aspiration syndrome caused by vernix caseosa. *Fetal. Diagn. Ther.* **20**:3, 194-196 (2005).
- 79 Midha, R.; Becker, L., E.: Vernix caseosa granulomatous meningitis (vernicomylia). *Can. J. Neurol. Sci.* **18**:1, 63-65 (1991). CA 1991243082.
- 80 Vacek, M.; Zaruvúcká, M.; Wimmer, Z.; Stránský, K.; Koutek, B.; Macková, M.; Demnerová, K.: Lipase-mediated hydrolysis of blackcurrant oil. *Enzyme Microb. Technol.* **27**:7, 531-536 (2010).
- 81 Vrkoslav, V.; Cvačka, J.: osobní sdělení (2013).
- 82 Lísa, M.; Velínská, H.; Holčapek, M.: Regioisomeric characterization of triacylglycerols using silver-Ion HPLC/MS and randomization synthesis of standards. *Anal. Chem.* **81**:10, 2903-3910 (2009).
- 83 Van Pelt, C. K.; Brenna, J., T.: Acetonitrile Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry To Locate Double Bonds in Polyunsaturated Fatty Acid Methyl Esters. *Anal. Chem.* **71**:10, 1981-1989 (1999).

## 7 Přílohy

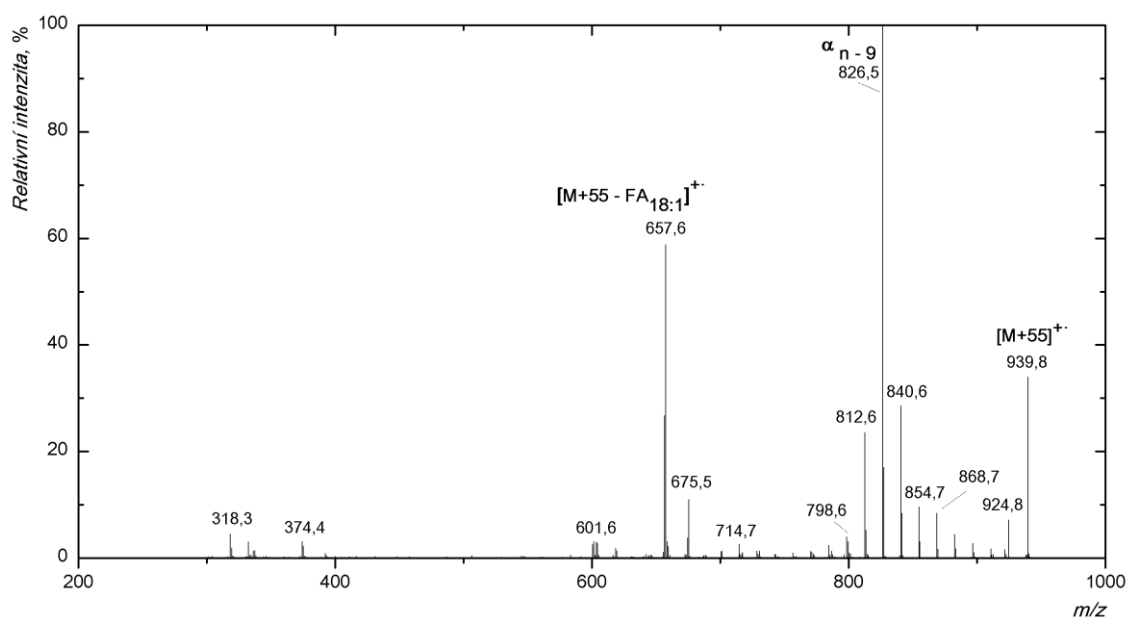
### Příloha A: Standardy triacylglycerolů



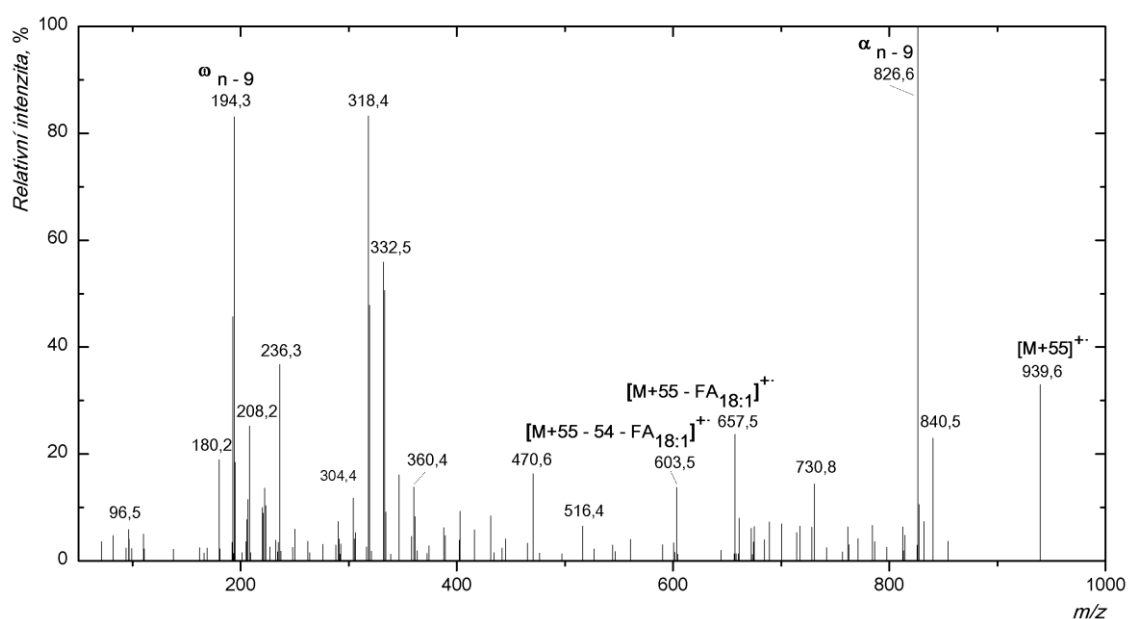
Příloha A1 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu tripalmitoleinu  $[M+55]^{+}$ . Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 0,5 Da, kolizní energie činila 30,0 % a intenzita spektra  $1,13 \cdot 10^2$  a.u..



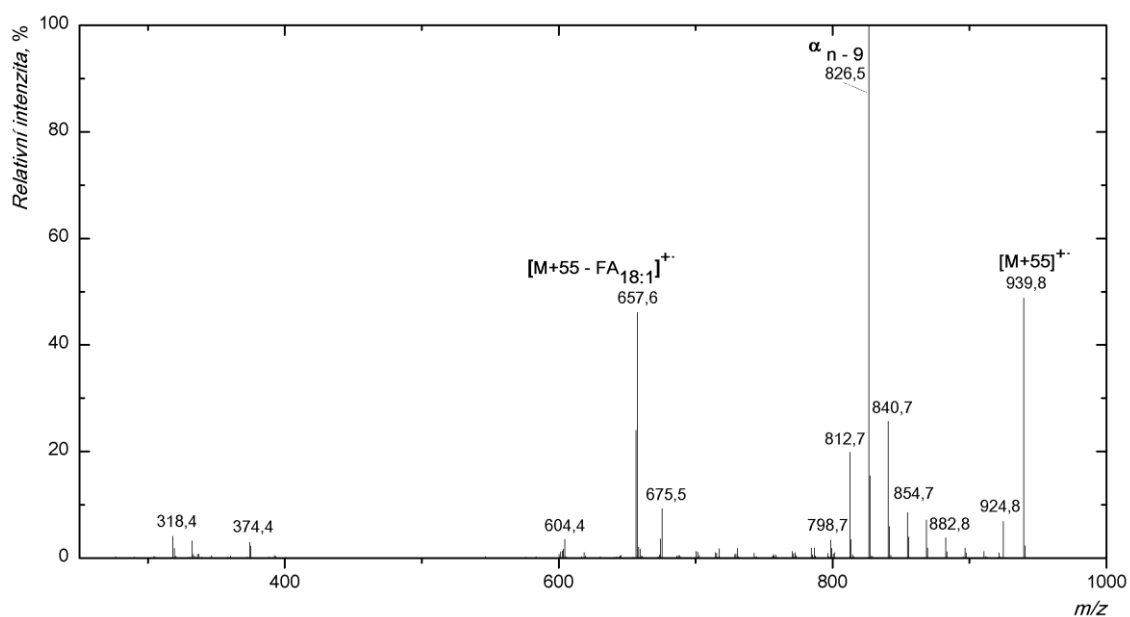
Příloha A2 APCI-MS/MS spektrum (PQD) aduktu tripalmitoleinu  $[M+55]^{+}$ . Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 0,5 Da, kolizní energie činila 32,0 % a intenzita spektra 2,16 a.u..



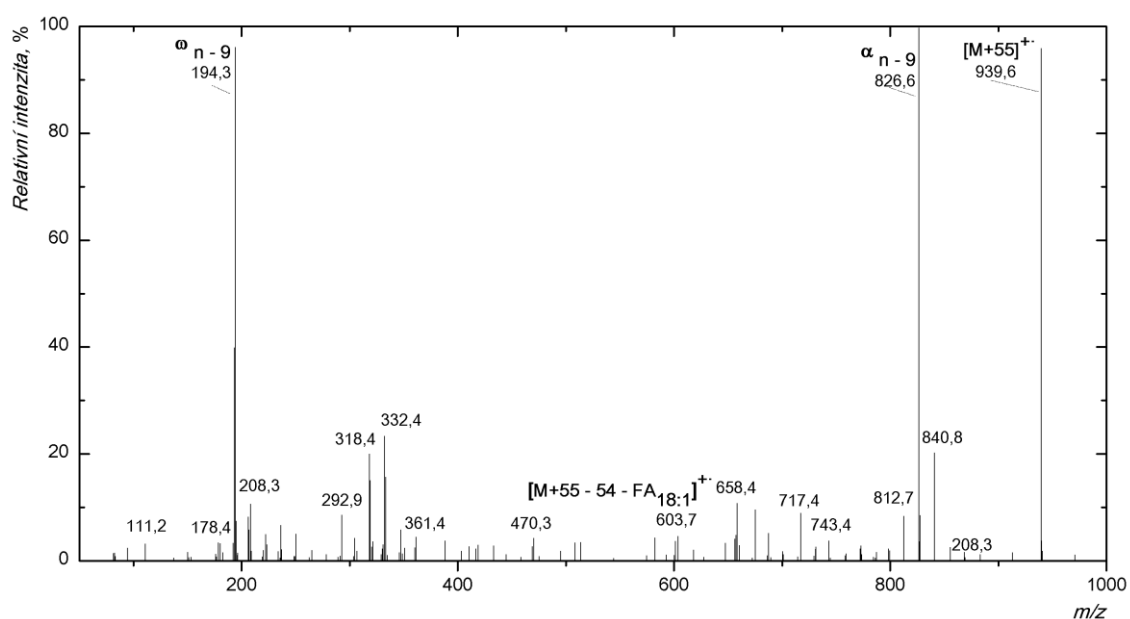
Příloha A3 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu trioleinu  $[M+55]^+$ . Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 0,6 Da, kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra  $4,30 \cdot 10^1$  a.u..



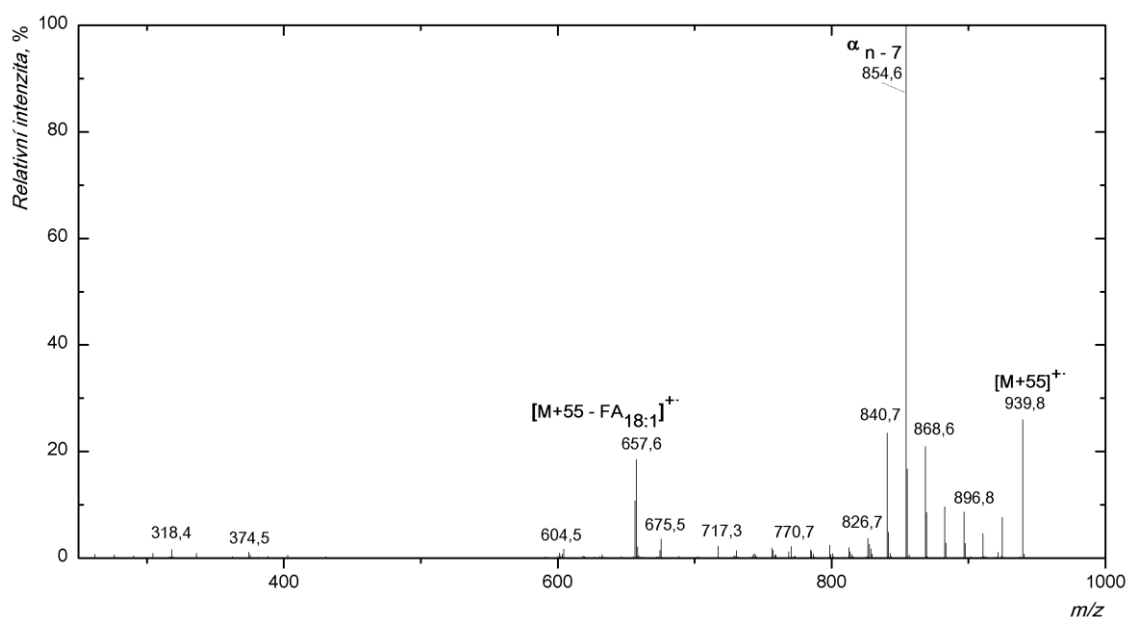
Příloha A4 APCI-MS/MS spektrum (PQD) aduktu trioleinu  $[M+55]^+$ . Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 0,6 Da, kolizní energie činila 35,5 % a intenzita spektra  $2,55 \cdot 10^{-1}$  a.u..



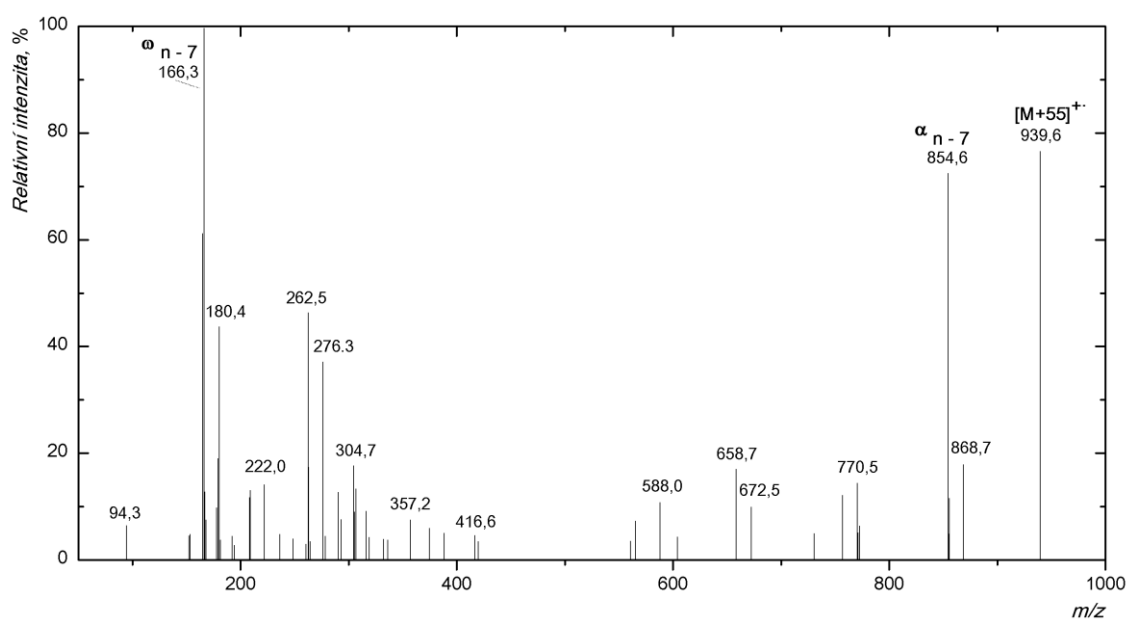
Příloha A5 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu trielaidinu  $[M+55]^+$ . Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 0,5 Da, kolizní energie činila 33,0 % a intenzita spektra  $6,45 \cdot 10^1$  a.u..



Příloha A6 APCI-MS/MS spektrum (PQD) aduktu trielaidinu  $[M+55]^+$ . Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 0,5 Da, kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra  $2,75 \cdot 10^{-1}$  a.u..

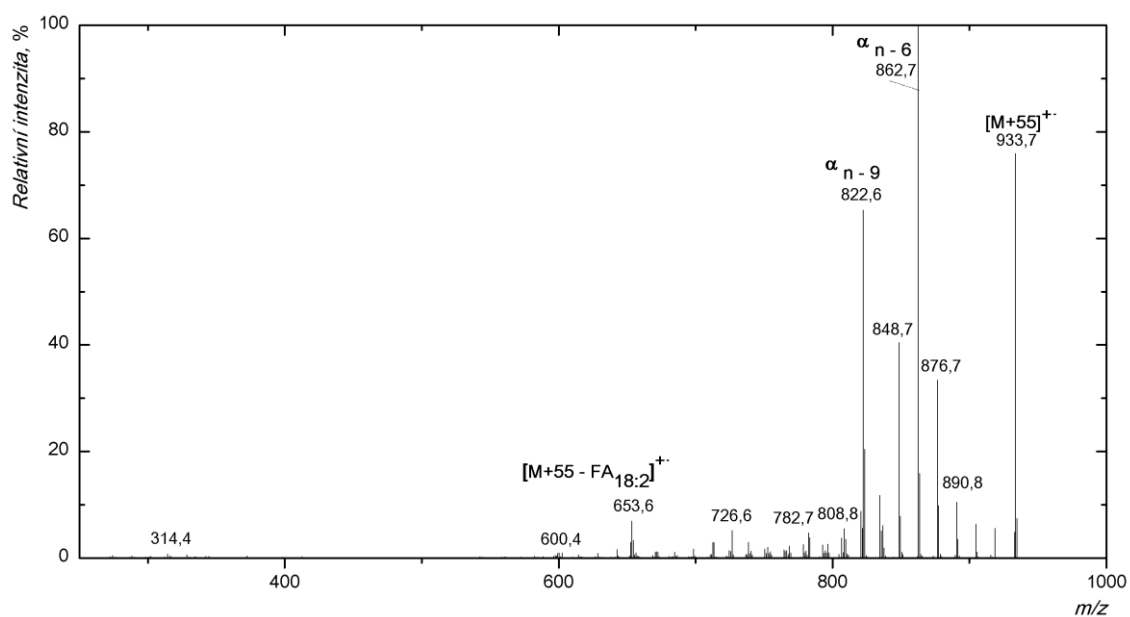


Příloha A7 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu trivaceninu  $[M+55]^+$ . Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 0,6 Da, kolizní energie činila 33,0 % a intenzita spektra  $2,75 \cdot 10^1$  a.u..

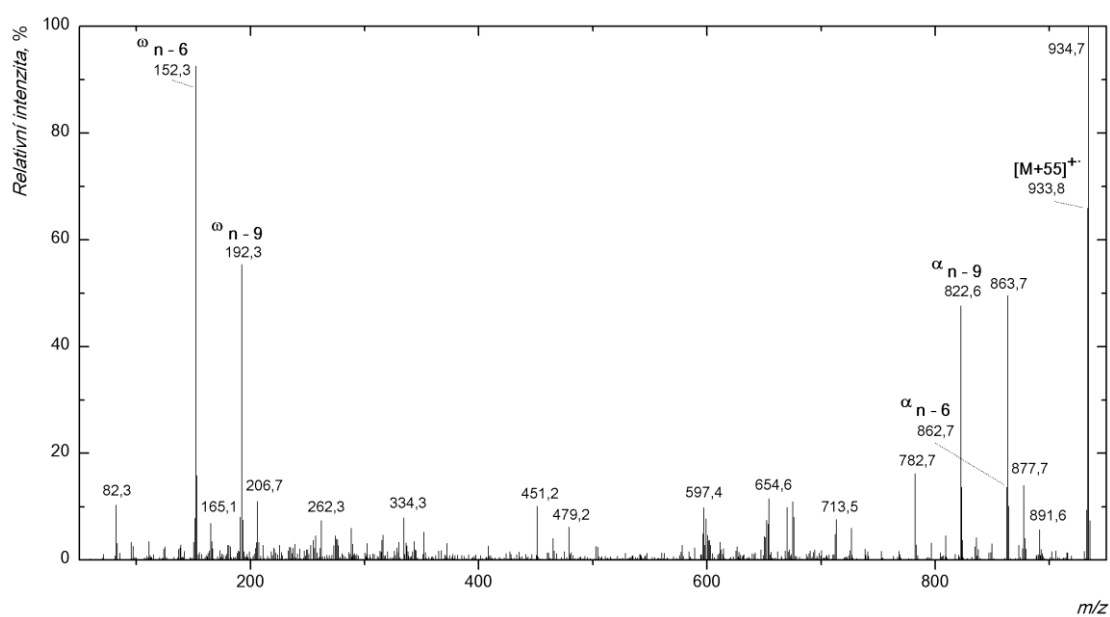


Příloha A8 APCI-MS/MS spektrum (PQD) aduktu trivaceninu  $[M+55]^+$ . Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 0,6 Da, kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra  $9,49 \cdot 10^{-1}$  a.u..

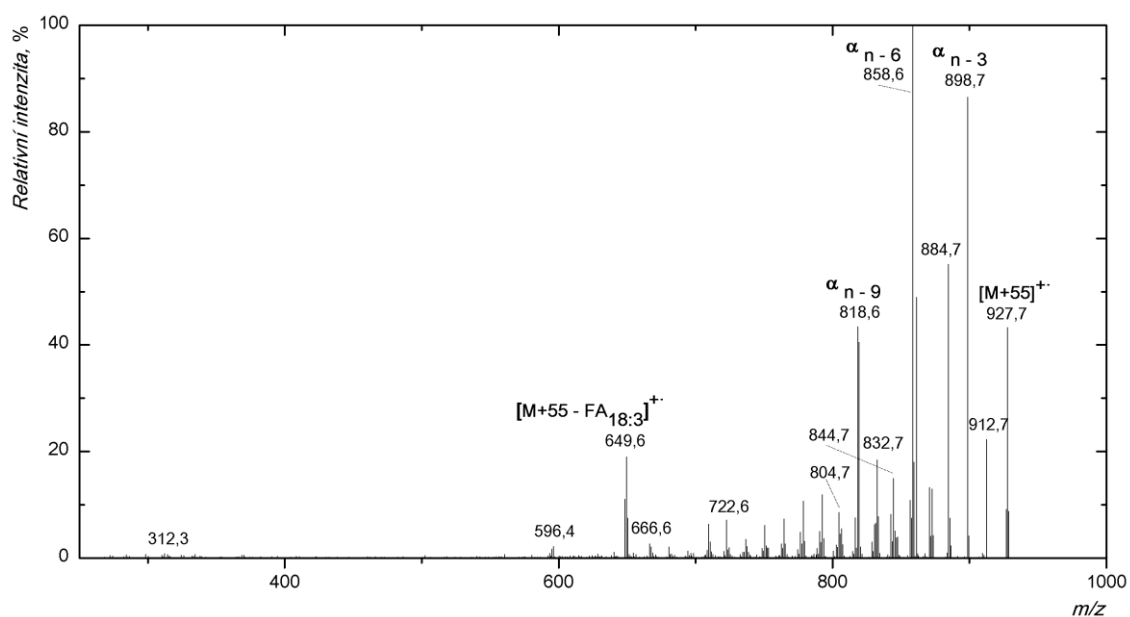




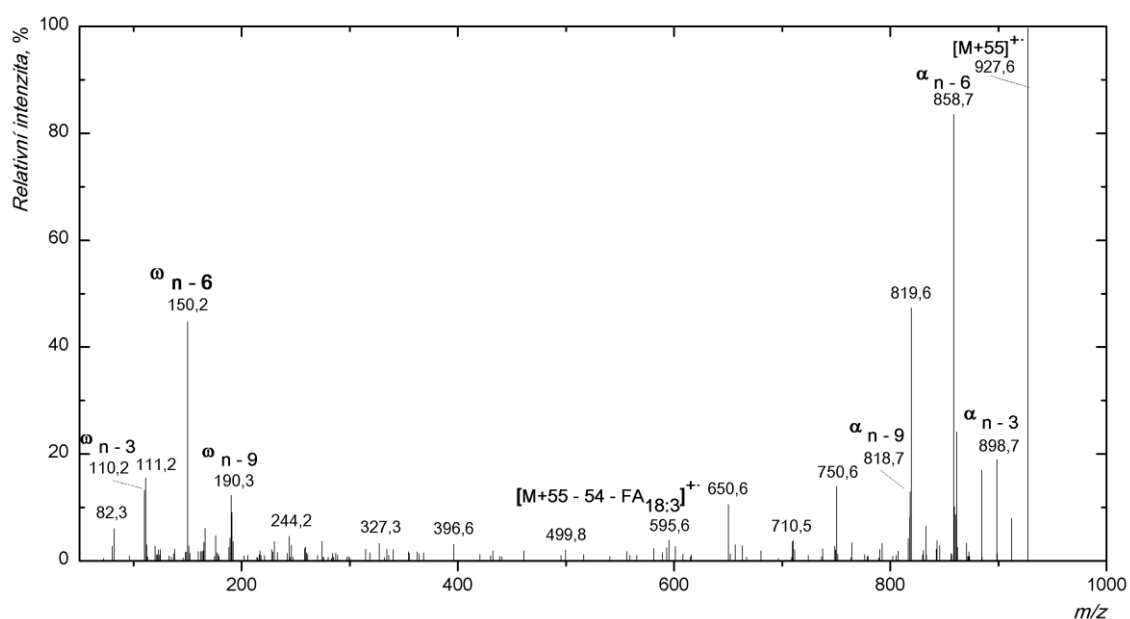
Příloha A9 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu trilinoelaidinu  $[M+55]^{+}$ . Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,3 Da, kolizní energie činila 30,0 % a intenzita spektra  $1,26 \cdot 10^2$  a.u..



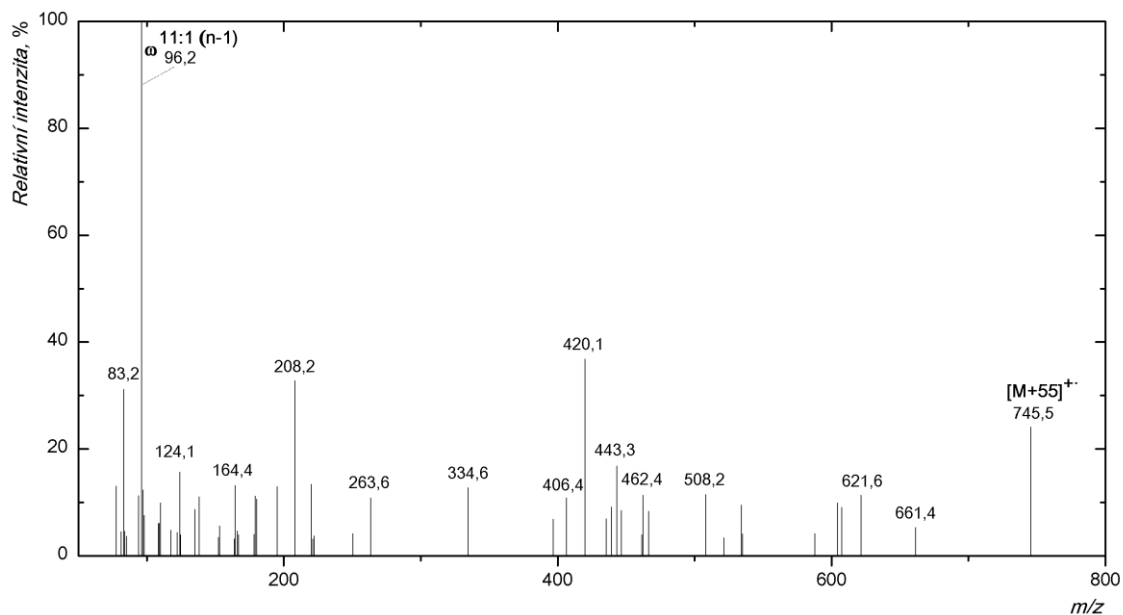
Příloha A10 APCI-MS/MS spektrum (PQD) aduktu trilinoelaidinu  $[M+55]^{+}$ . Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,3 Da, kolizní energie činila 35,0 % a intenzita spektra 3,00 a.u..



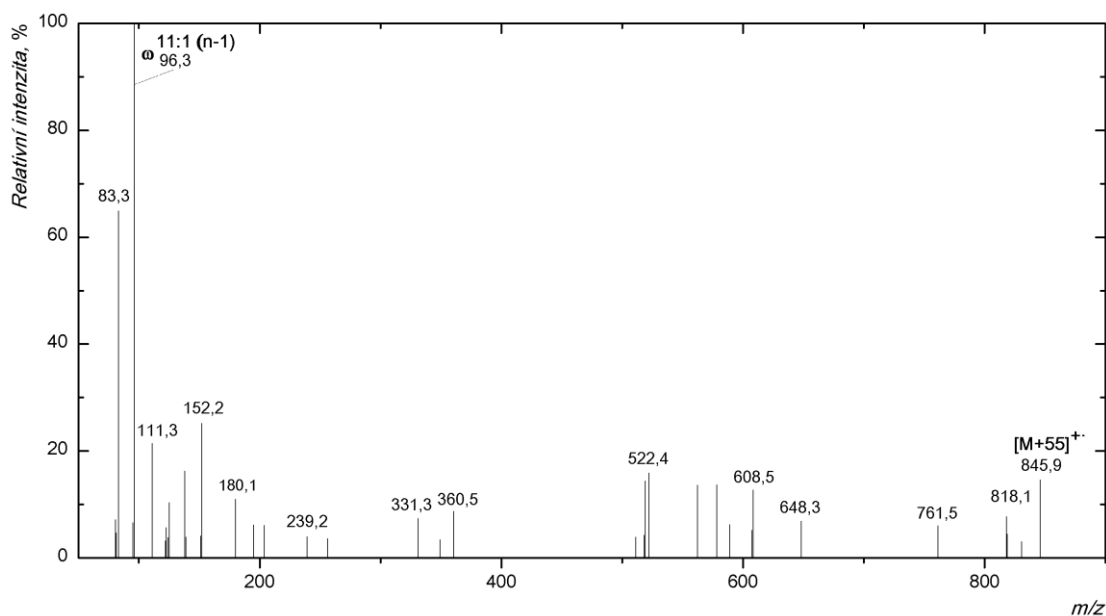
Příloha A11 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu trialfa linoleninu  $[M+55]^+$ . Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,0 Da a kolizní energie činila 31,0 % a intenzita spektra  $1,15 \cdot 10^1$  a.u..



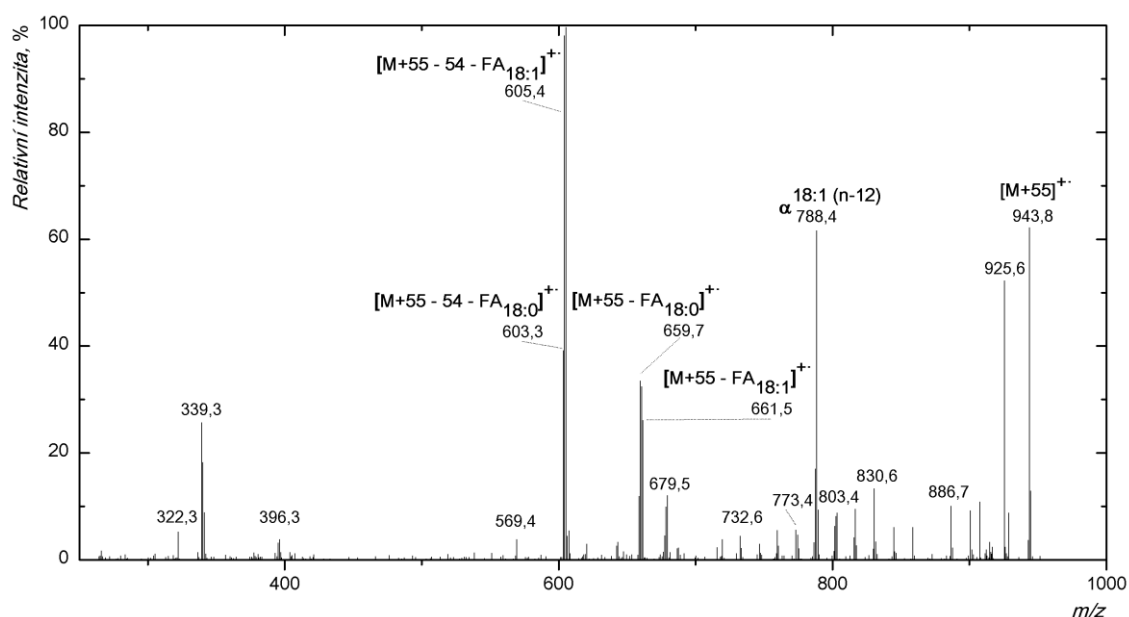
Příloha A12 APCI-MS/MS spektrum (PQD) aduktu trialfa linoleninu  $[M+55]^+$ . Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,0 Da, kolizní energie činila 31,0 % a intenzita spektra  $2,45 \cdot 10^{-1}$  a.u..

**Příloha B: Randomizační směsi**

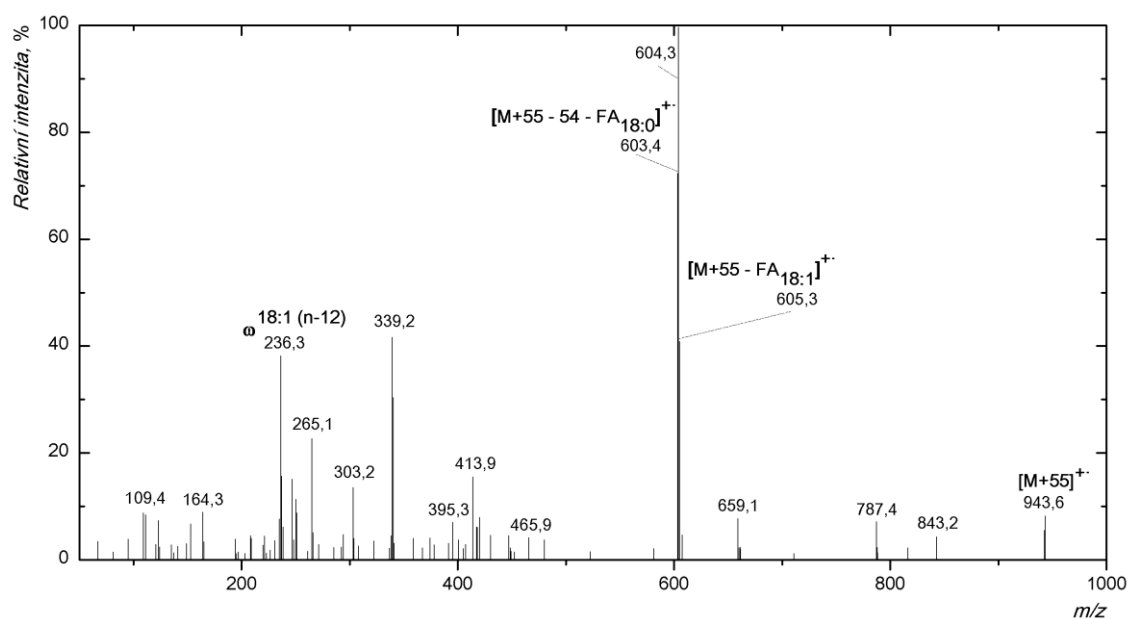
Příloha B1 APCI-MS/MS spektrum (PQD) aduktu randomizační směsi tristearinu a triundecenoinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny stearové a dvěma acyly kyselinou undecylové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 2,0 Da, kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra  $6,82 \cdot 10^{-2}$  a.u..



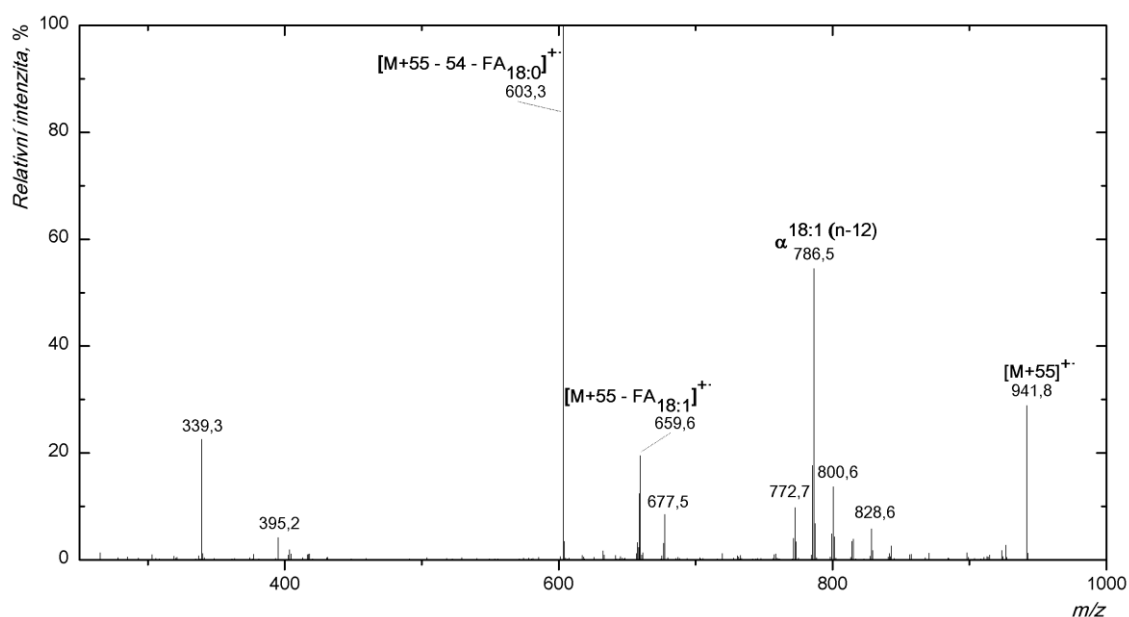
Příloha B2 APCI-MS/MS spektrum (PQD) aduktu randomizační směsi tristearinu a triundecenoinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny undecylové a dva acyly kyseliny stearové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 2,1 Da, kolizní energie činila 35,0 % a intenzita spektra 8,09 a.u..



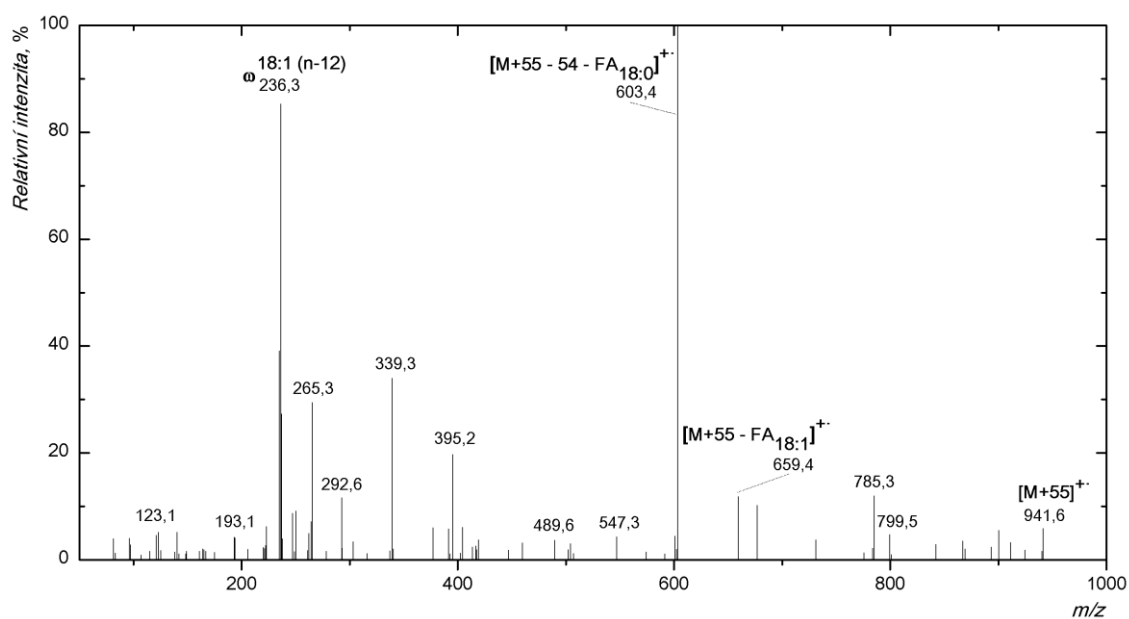
Příloha B3 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a tripetroselininu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny petroselinové a dva acyly kyseliny stearové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 32,5 % a intenzita spektra 1,10 a.u..



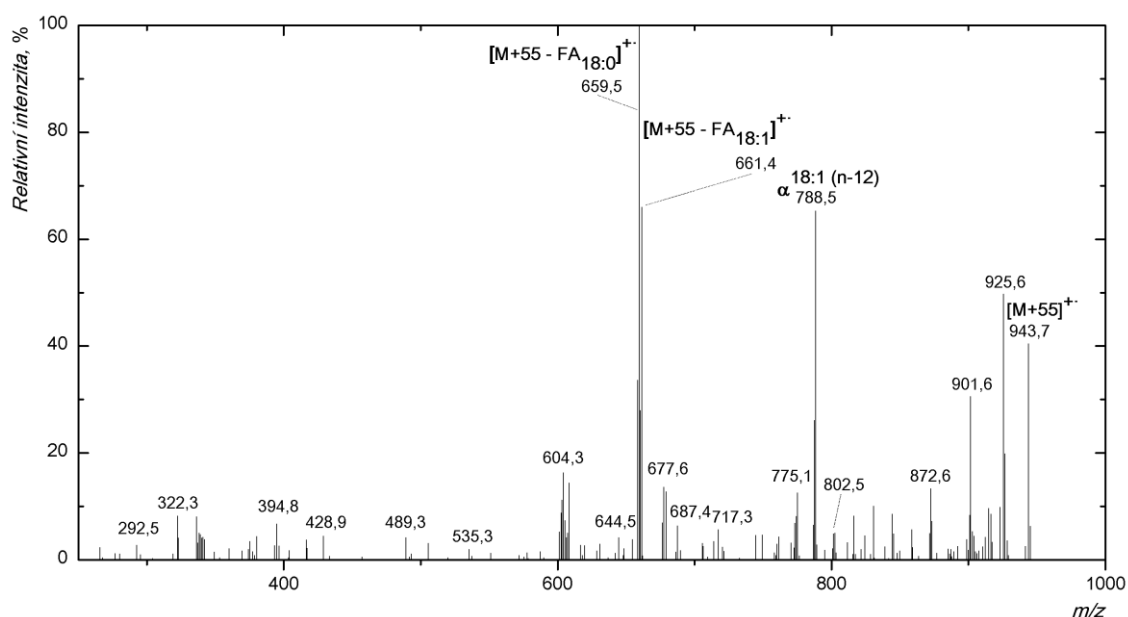
Příloha B4 APCI-MS/MS spektrum (PQD) aduktu randomizační směsi tristearinu a tripetroselininu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny petroselinové a dva acyly kyseliny stearové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 35,5 % a intenzita spektra  $1,61 \cdot 10^{-1}$  a.u..



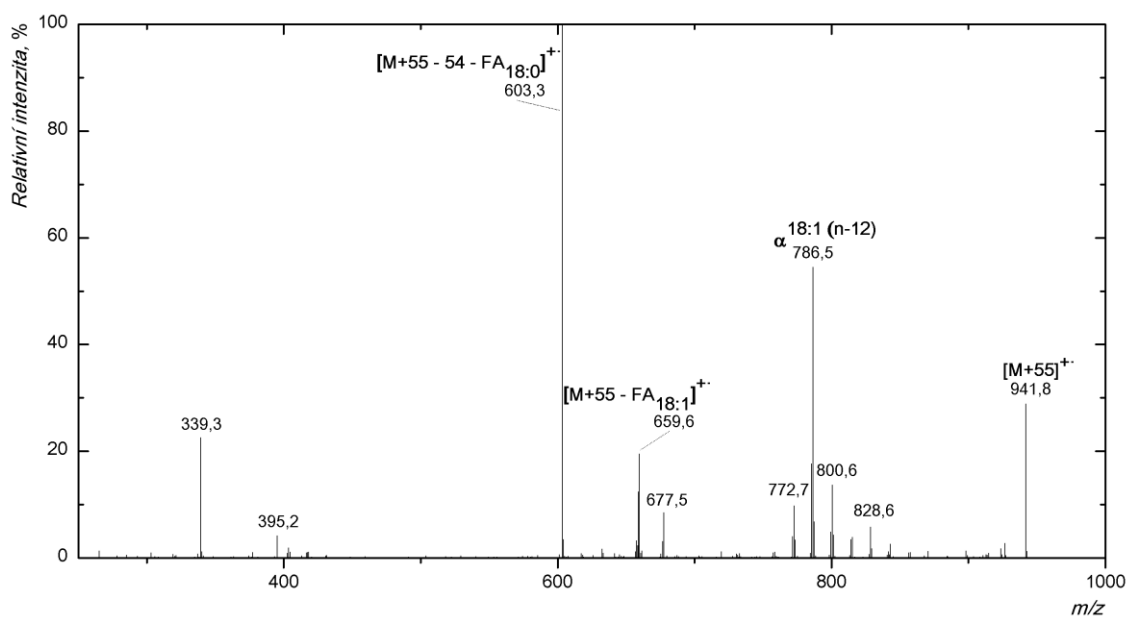
Příloha B5 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a tripetroselininu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny stearové a dva acyly kyseliny petroselinové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 32,0 % a intenzita spektra 8,09 a.u..



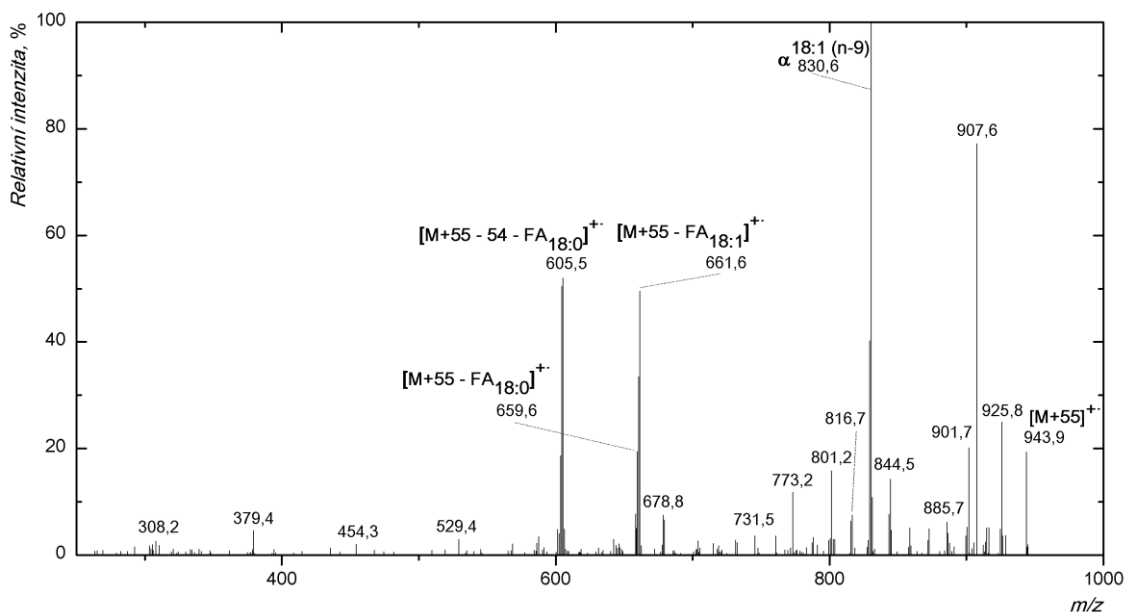
Příloha B6 APCI-MS/MS spektrum (PQD) aduktu randomizační směsi tristearinu a tripetroselininu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny stearové a dva acyly kyseliny petroselinové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 2,3 Da, kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra  $2,71 \cdot 10^{-1}$  a.u..



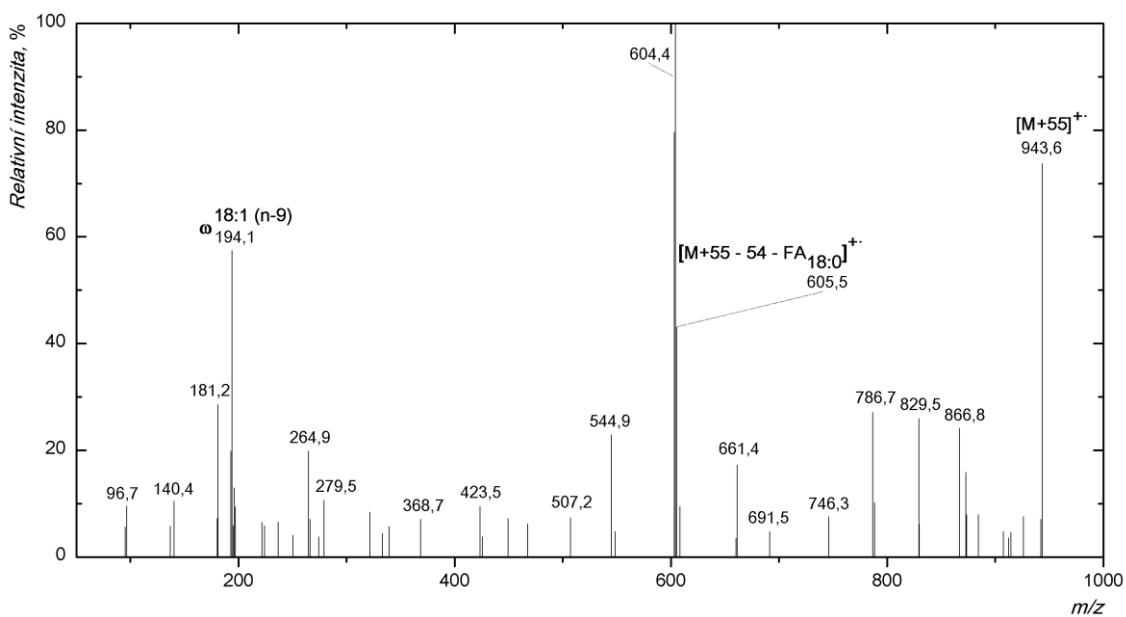
Příloha B7 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a tripetroselaidinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny petroselaidinové a dva acyly kyseliny stearové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra 1,69 a.u..



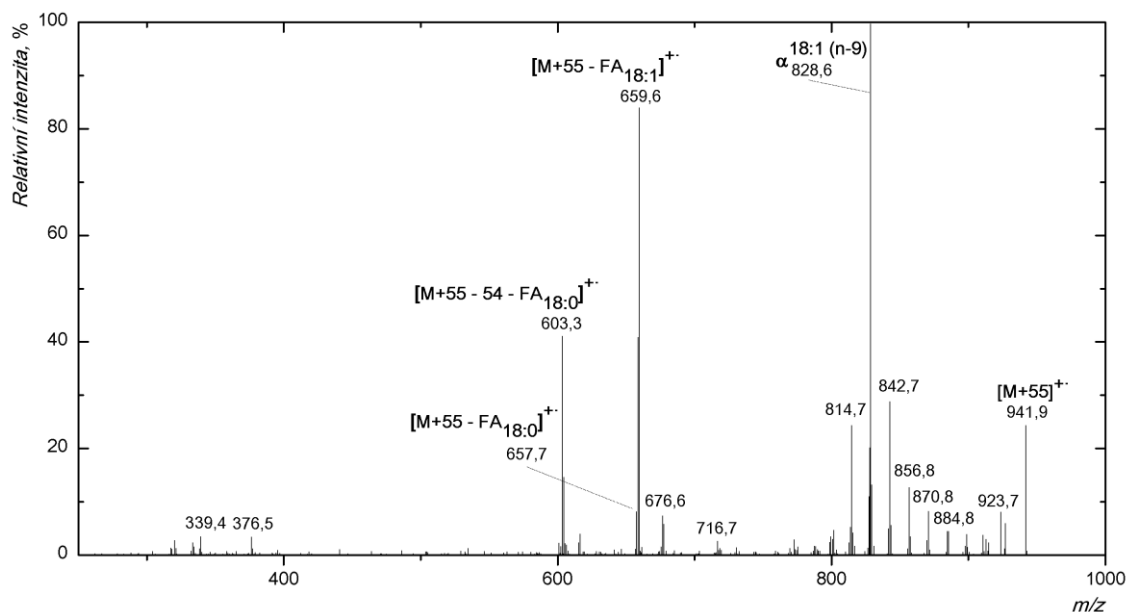
Příloha B8 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a tripetroselaidinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny stearové a dva acyly kyseliny petroselaidinové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,4 Da, kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra 7,40 a.u..



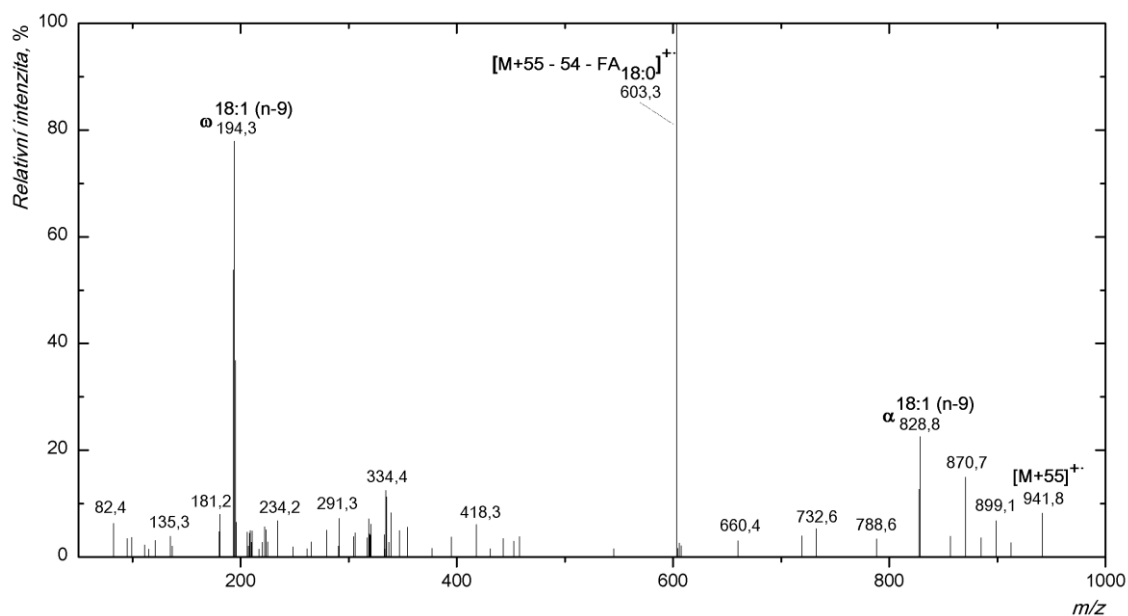
Příloha B9 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a trioleinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny olejové a dva acyly kyseliny stearové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,8 Da, kolizní energie činila 33,5 % a intenzita spektra  $9,73 \cdot 10^{-1}$  a.u..



Příloha B10 APCI-MS/MS spektrum (PQD) aduktu randomizační směsi tristearinu a trioleinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny olejové a dva acyly kyseliny stearové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 35,0 % a intenzita spektra  $3,61 \cdot 10^{-2}$  a.u..

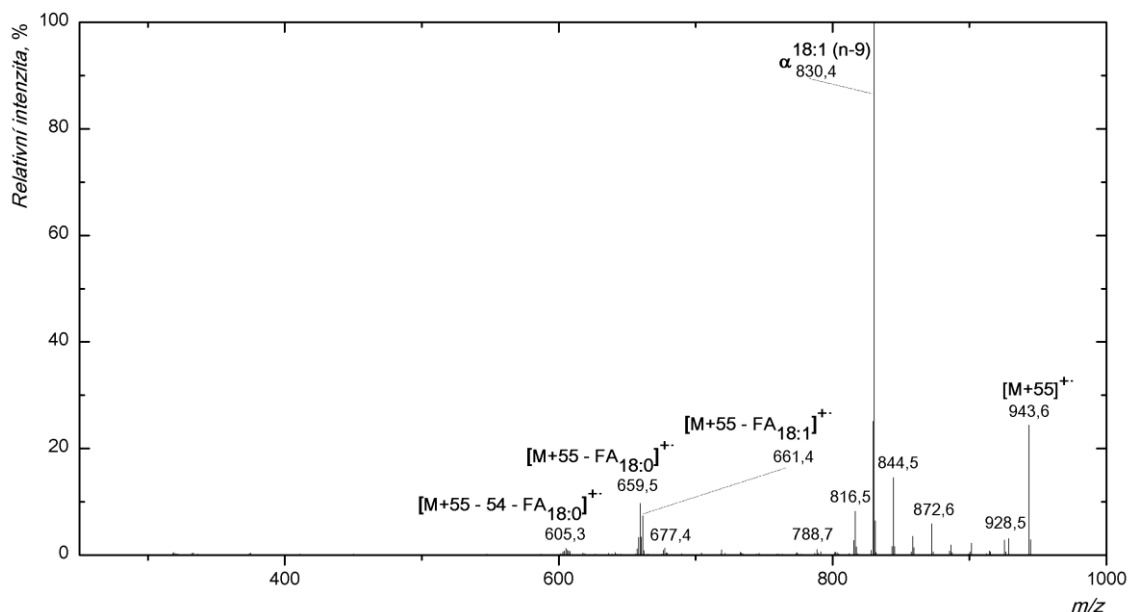


Příloha B11 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a trioleinu  $[M+55]^{+}$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny stearové a dva acyly kyseliny olejové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 1,4 Da, kolizní energie činila 35,0 % a intenzita spektra 3,06 a.u..

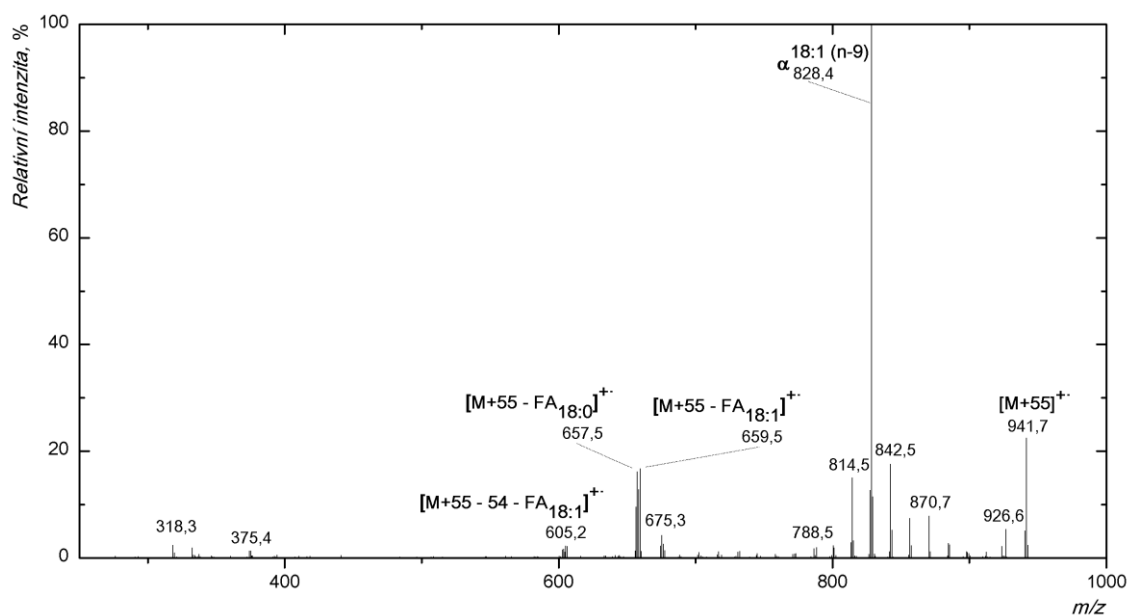


Příloha B12 APCI-MS/MS spektrum (PQD) aduktu randomizační směsi tristearinu a trioleinu  $[M+55]^{+}$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny stearové a dva acyly kyseliny olejové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 34,5 % a intenzita spektra  $7,85 \cdot 10^{-1}$  a.u..

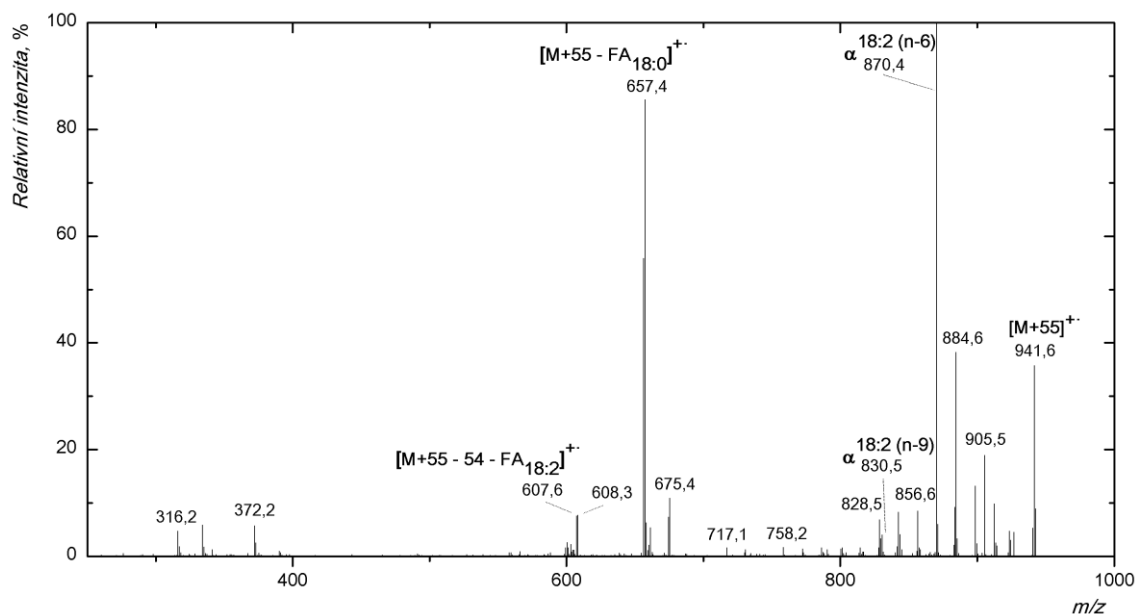




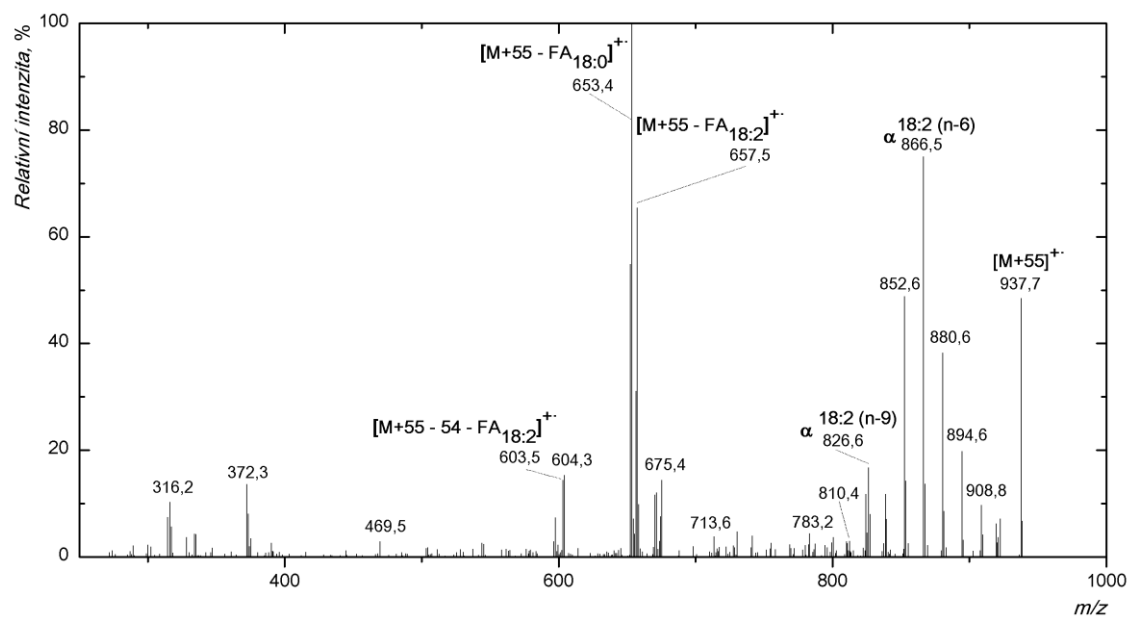
Příloha B13 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a trielaidinu [M+55]<sup>+-</sup>. TG obsahuje jeden acyl kyseliny elaidinové a dva acyly kyseliny stearové. Mobilní fází byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 1,9 Da, kolizní energie činila 30,0 % a intenzita spektra  $3,29 \cdot 10^1$  a.u..



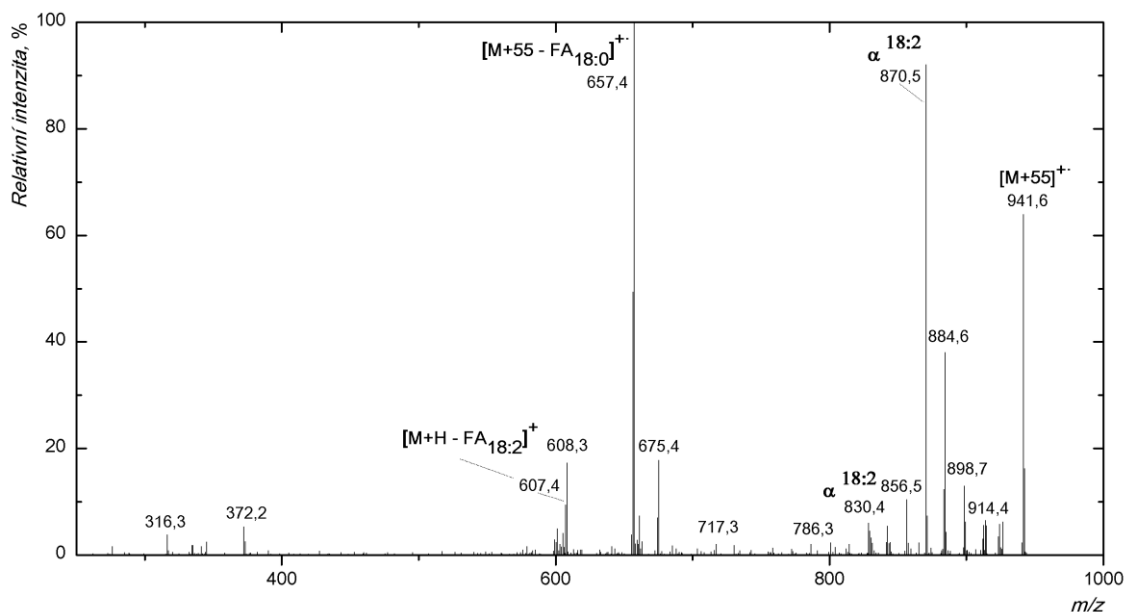
Příloha B14 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a trielaidinu [M+55]<sup>+-</sup>. TG obsahuje jeden acyl kyseliny stearové a dva acyly kyseliny elaidinové. Mobilní fází byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 1,9 Da, kolizní energie činila 33,0 % a intenzita spektra  $2,02 \cdot 10^1$  a.u..



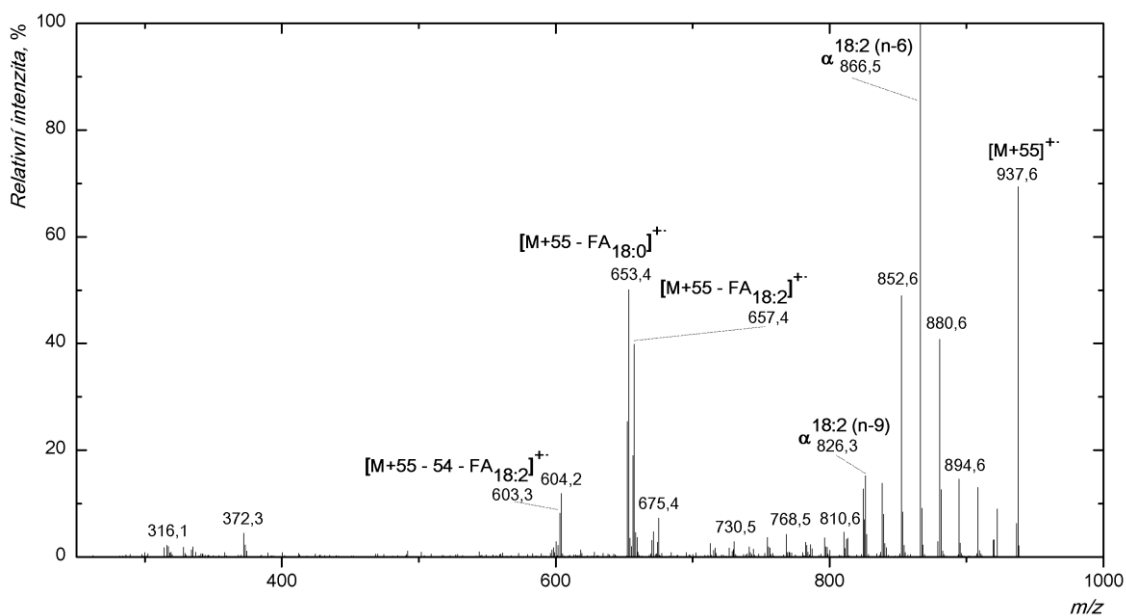
Příloha B15 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a trilinoleinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny linolové a dva acyly kyseliny stearové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,9 Da, kolizní energie činila 33,5 % a intenzita spektra  $1,42 \cdot 10^1$  a.u..



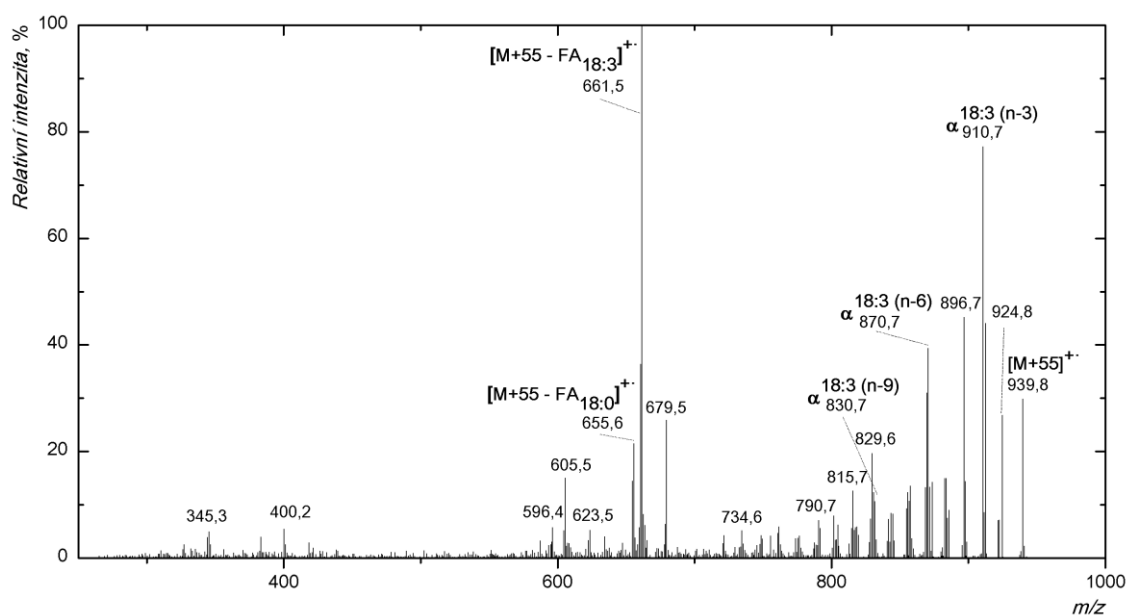
Příloha B16 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a trilinoleinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny stearové a dva acyly kyseliny linolové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra  $1,22 \cdot 10^1$  a.u..



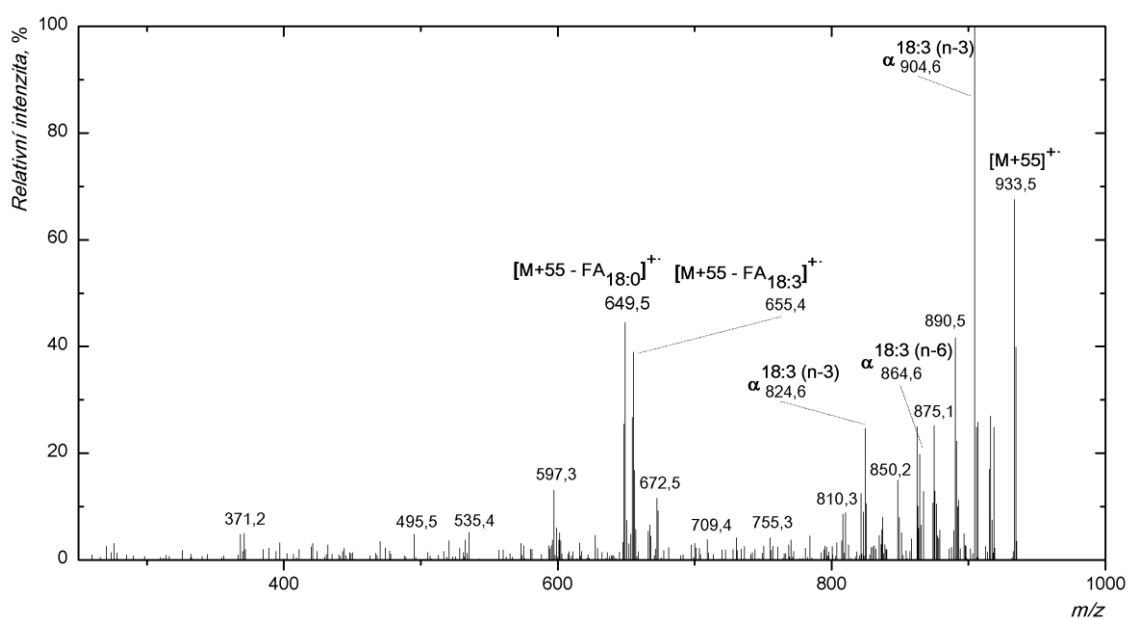
Příloha B17 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a trilinoelaidinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny linoelainové a dva acyly kyseliny stearové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,8 Da, kolizní energie činila 33,0 % a intenzita spektra 8,26 a.u..



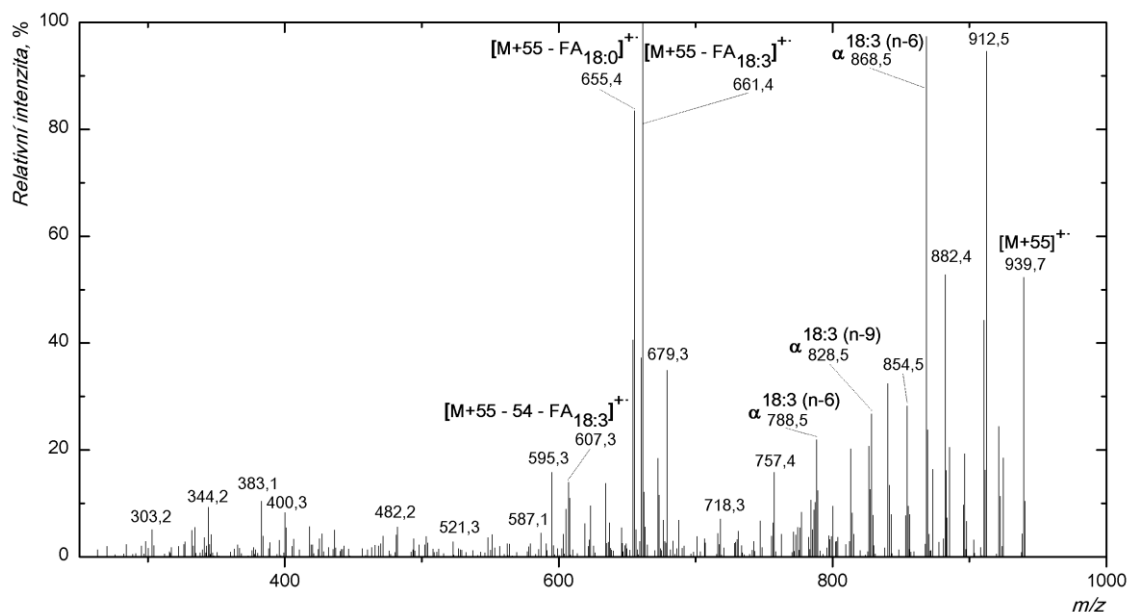
Příloha B28 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a trilinoelaidinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny stearové a dva acyly kyseliny linoelaidové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 33,0 % a intenzita spektra  $1,09 \cdot 10^4$  a.u..



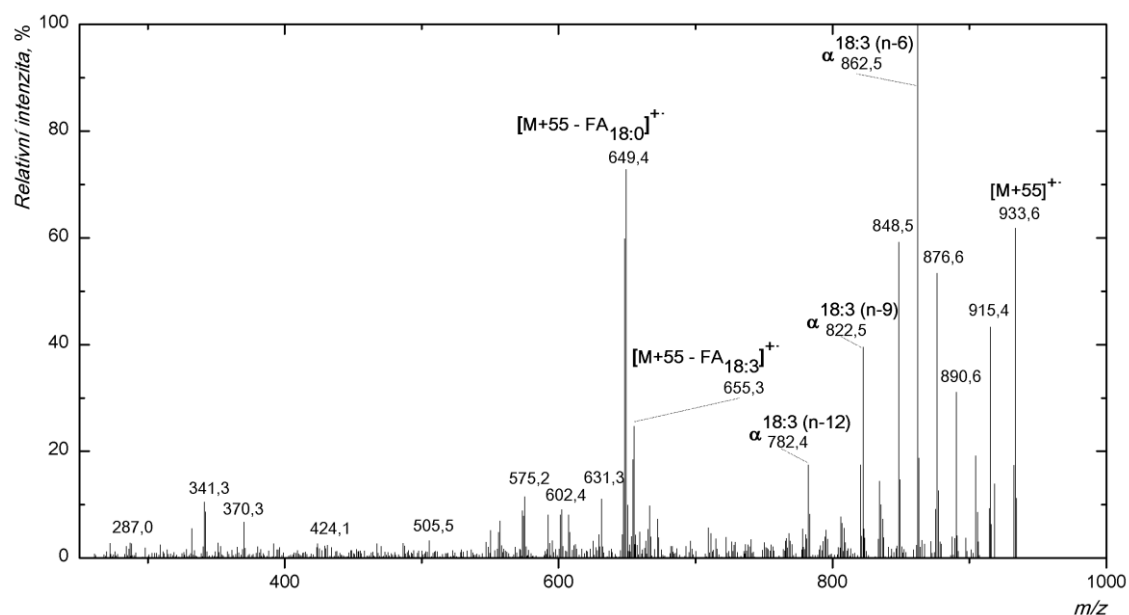
Příloha B19 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a trialfa linoleninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny alfa linolenové a dva acyly kyseliny stearové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 36,0 % a intenzita spektra 3,85 a.u..



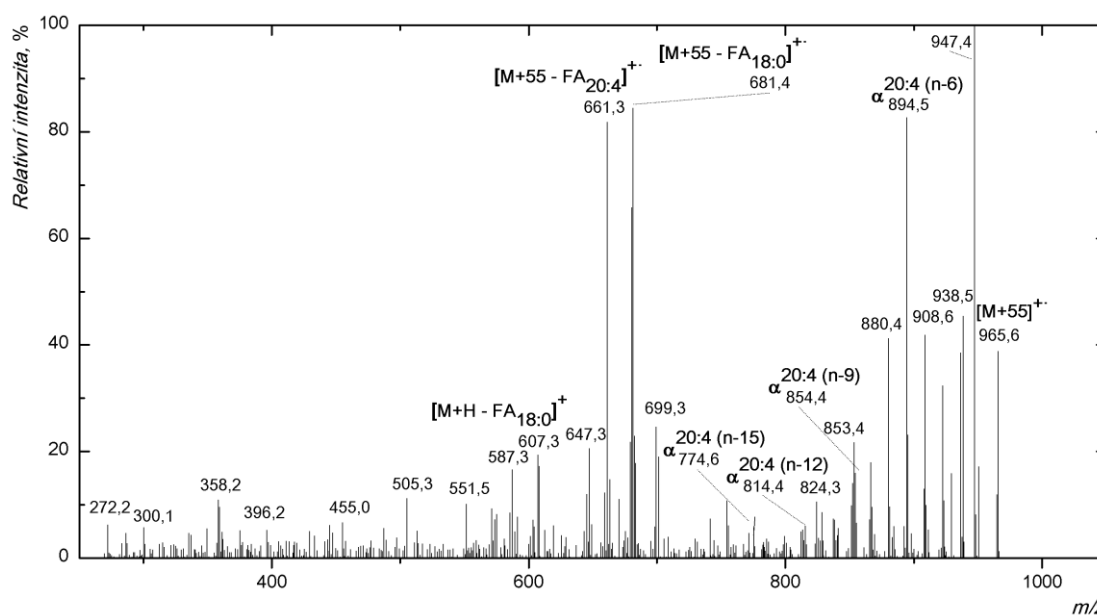
Příloha B20 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a trialfa linoleninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny stearové a dva acyly kyseliny alfa linolenové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,7 Da, kolizní energie činila 33,0 % a intenzita spektra 2,23 a.u..



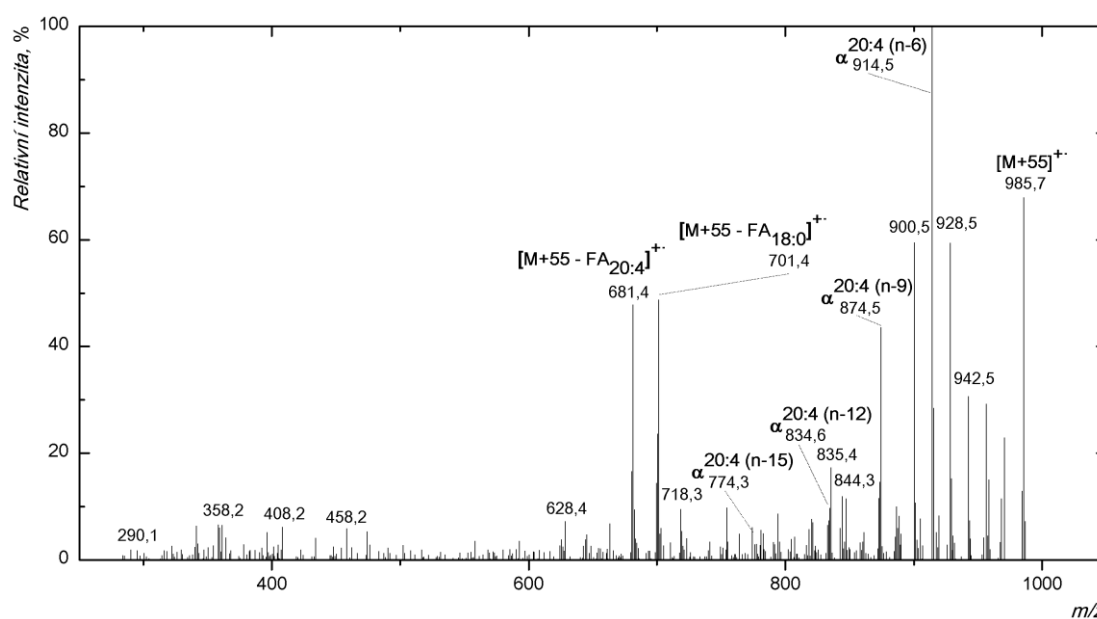
Příloha B21 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a trigama linoleninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny gama linolenové a dva acyl kyseliny stearové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , izolační šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra 3,80 a.u..



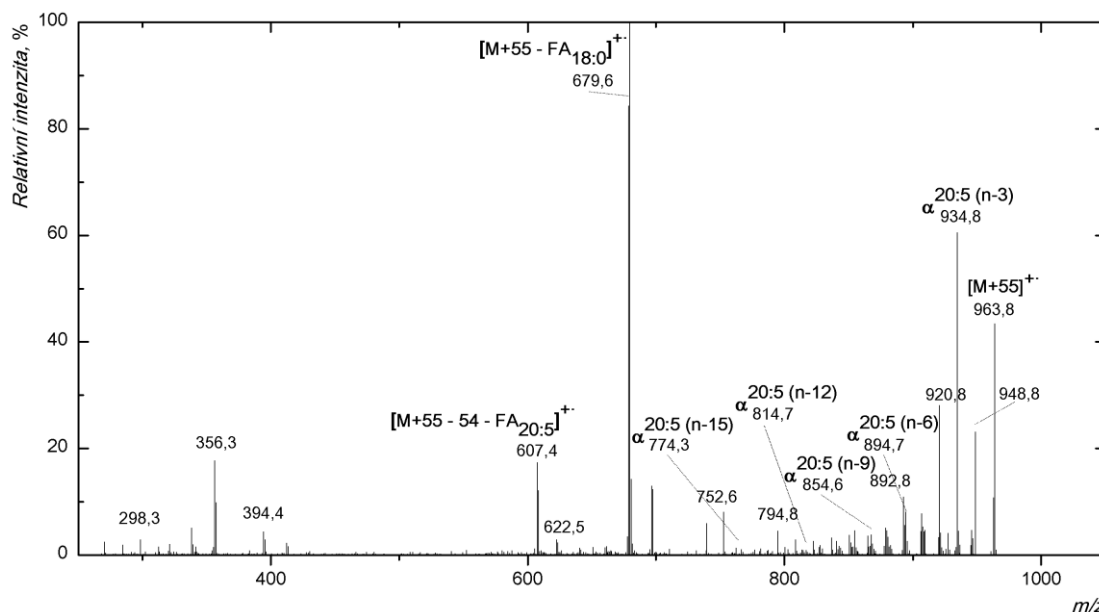
Příloha B22 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a trigama linoleninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny stearové a dva acyl kyseliny gama linolenové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,9 Da, kolizní energie činila 32,0 % a intenzita spektra 3,81 a.u..



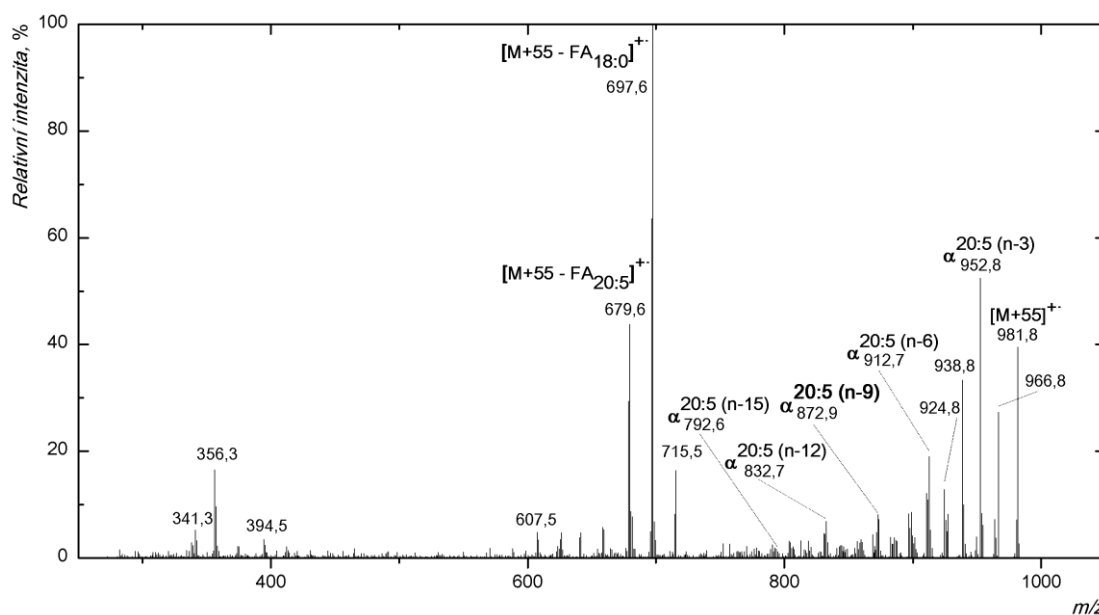
Příloha B23 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a triarachidoninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny arachidonové a dva acyly kyseliny stearové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,8 Da, kolizní energie činila 33,0 % a intenzita spektra 3,45 a.u..



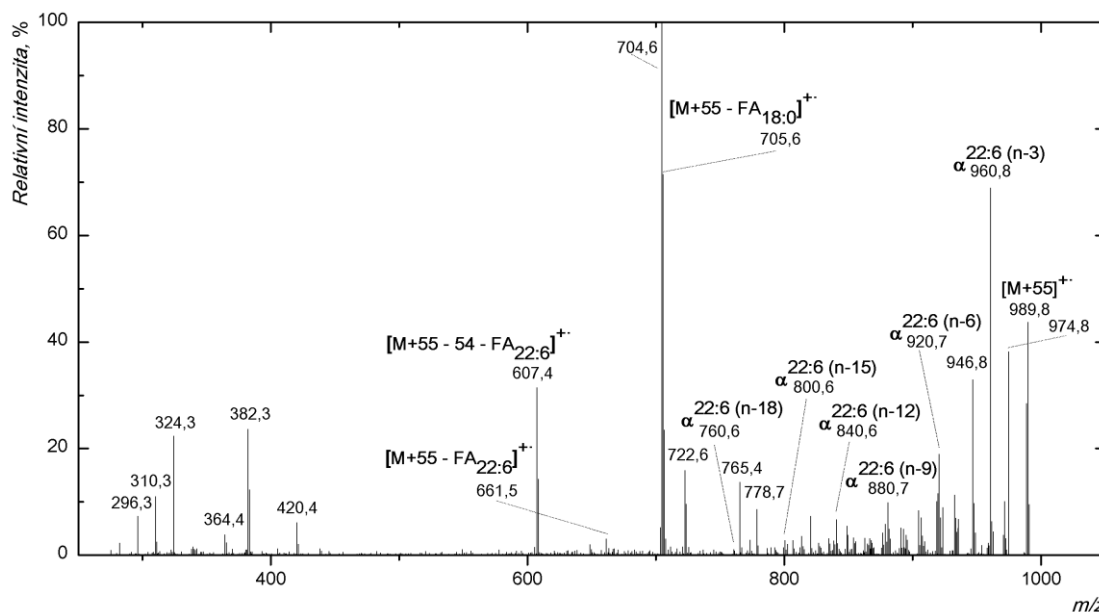
Příloha B24 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a triarachidoninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny stearové a dva acyly kyseliny arachidonové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,8 Da, kolizní energie činila 33,0 % a intenzita spektra 3,77 a.u..



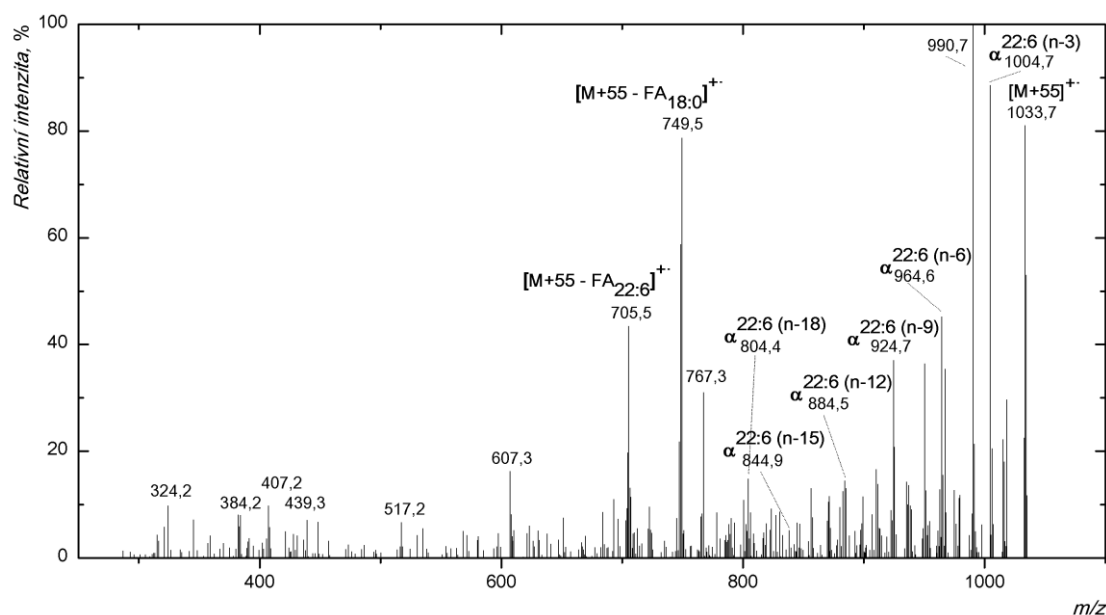
Příloha B25 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a triekosapentaenoinu [M+55]<sup>+</sup>. TG obsahuje jeden acyl kyseliny eikosapentaenové a dva acyly kyseliny stearové. Mobilní fází byl 100 % acetonitril o průtoku 500 µl/min, šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 36,0 % a intenzita spektra 5,45 a.u..



Příloha B26 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a triekosapentaenoinu [M+55]<sup>+</sup>. TG obsahuje jeden acyl kyseliny stearové a dva acyly kyseliny eikosapentaenové. Mobilní fází byl 100 % acetonitril o průtoku 500 µl/min, šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 35,0 % a intenzita spektra 5,15 a.u..

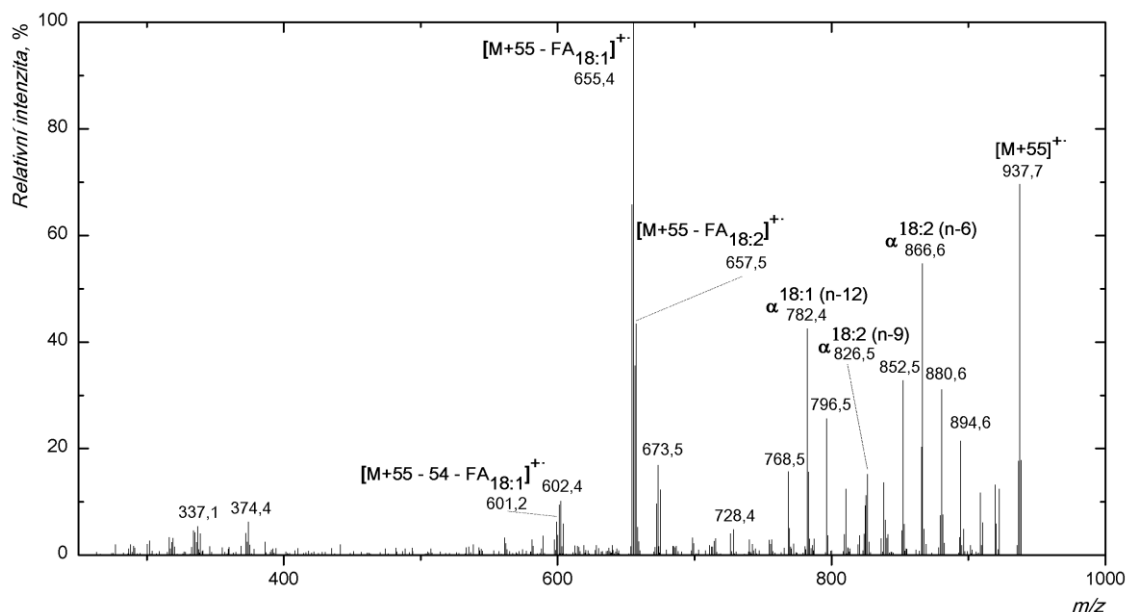


Příloha B27 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a tridokosahehexaenoinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny dokosahehexaenové a dva acyly kyseliny stearové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 2,0 Da, kolizní energie činila 35,0 % a intenzita spektra 3,19 a.u..

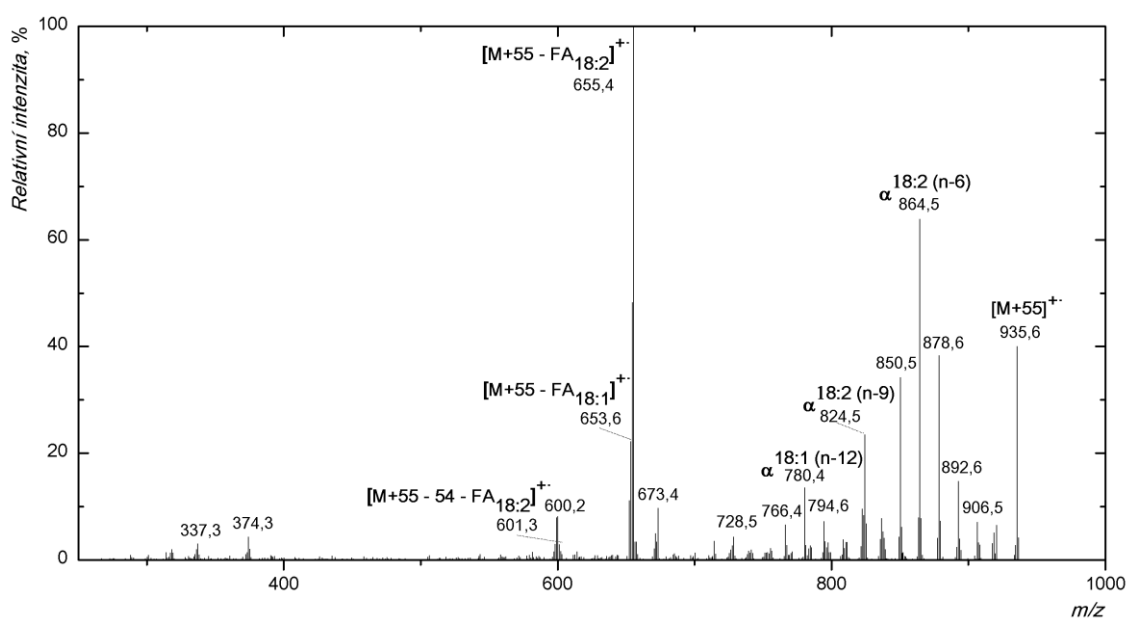


Příloha B28 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tristearinu a tridokosahehexaenoinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny stearové a dva acyly kyselin dokosahehexaenové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 2,0 Da, kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra 2,22 a.u..

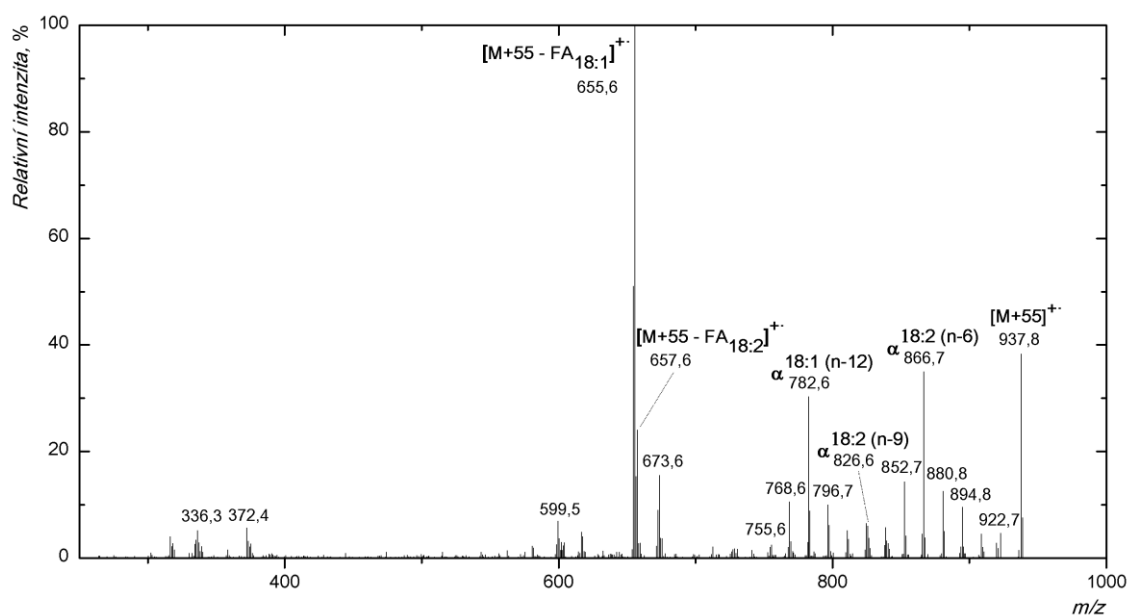




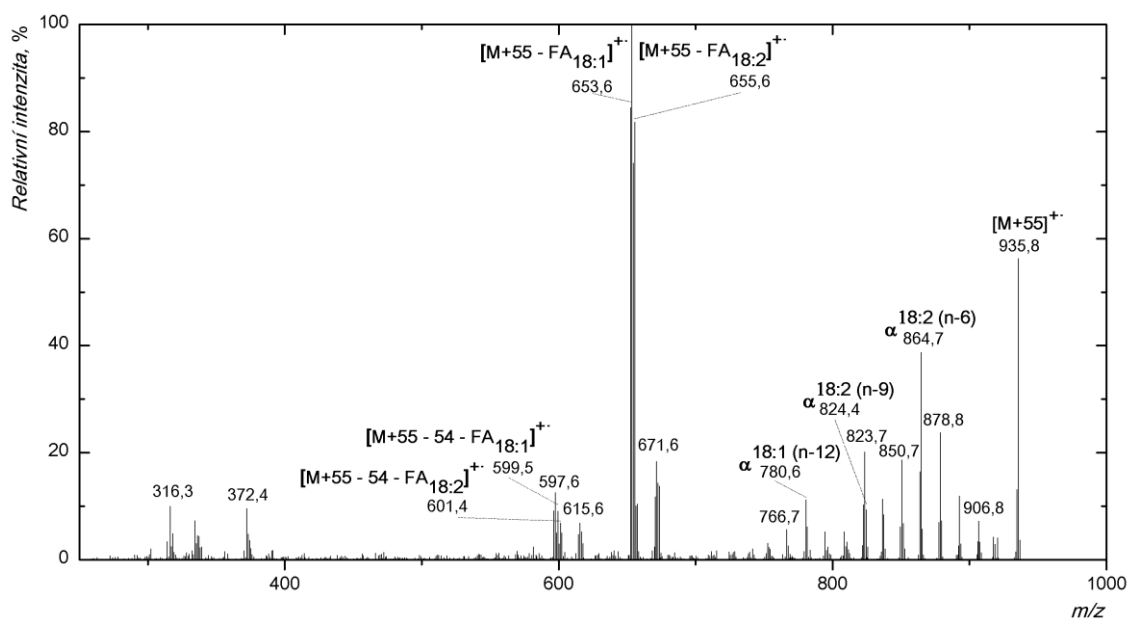
Příloha B29 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tripetroselininu a trilinoleinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny linolové a dva acyly kyseliny petroselinové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 1,7 Da, kolizní energie činila 33,5 % a intenzita spektra 6,26 a.u..



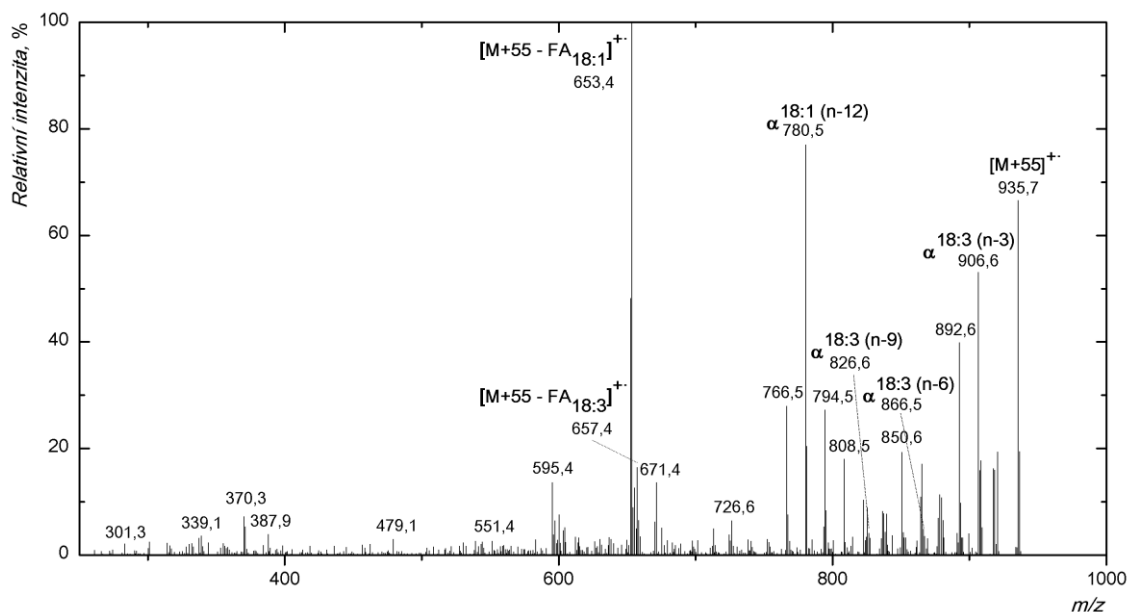
Příloha B30 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tripetroselininu a trilinoleinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny petroselinové a dva acyly kyseliny linolové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 1,7 Da, kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra  $1,61 \cdot 10^1$  a.u..



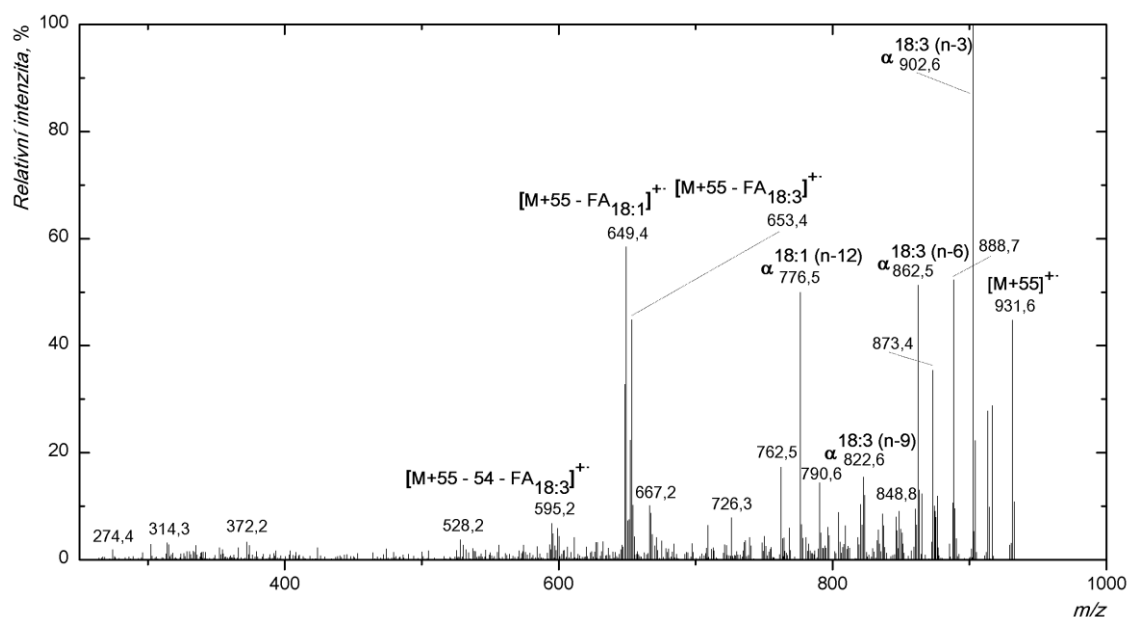
Příloha B31 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tripetroselininu a trilinoelaidinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny linoleaidové a dva acyly kyseliny petroselinové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 36,0 % a intenzita spektra  $1,03 \cdot 10^1$  a.u..



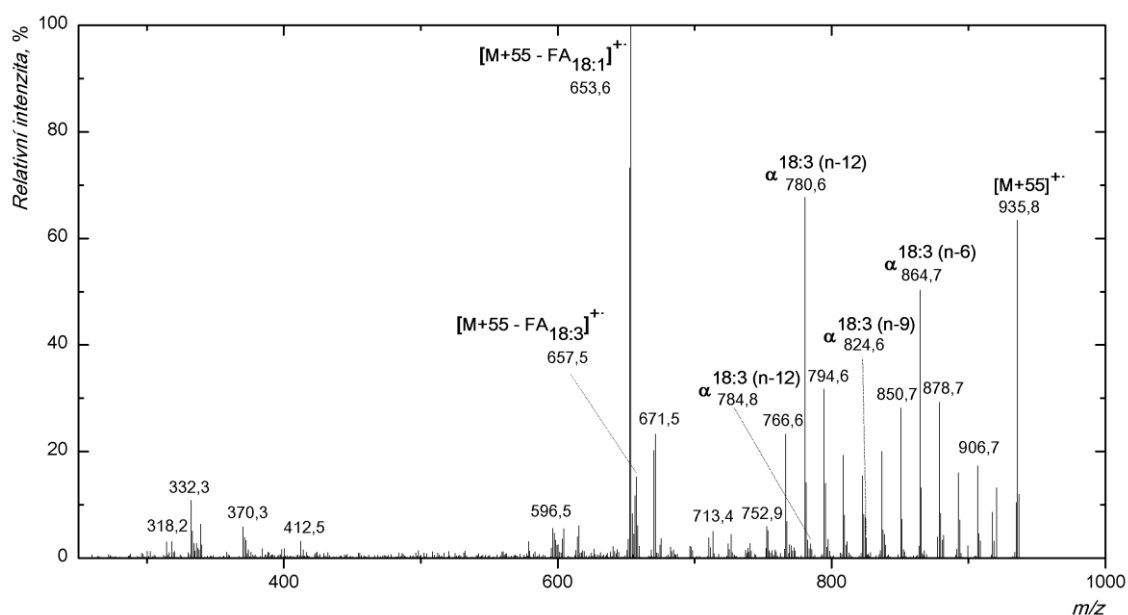
Příloha B32 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tripetroselininu a trilinoelaidinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny petroselinové a dva acyly kyseliny linoleaidové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,5 Da, kolizní energie činila 36,0 % a intenzita spektra 5,20 a.u..



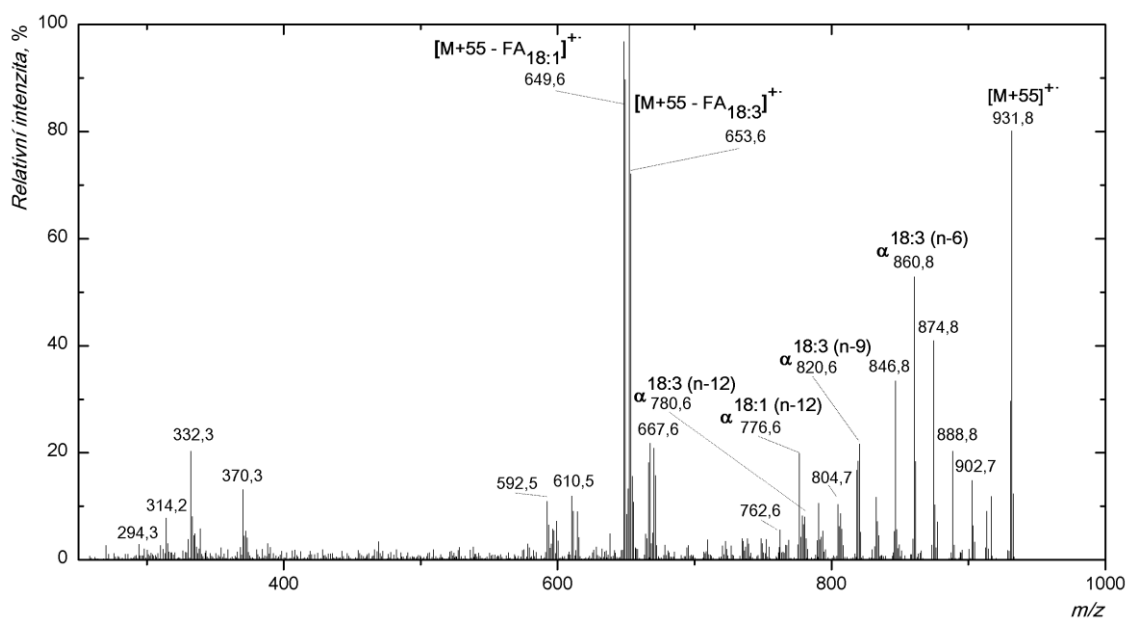
Příloha B33 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tripetroselininu a trialfa linolenin  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny alfa linolenové a dva acyly kyseliny petroselinové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 34,5 % a intenzita spektra 4,23 a.u..



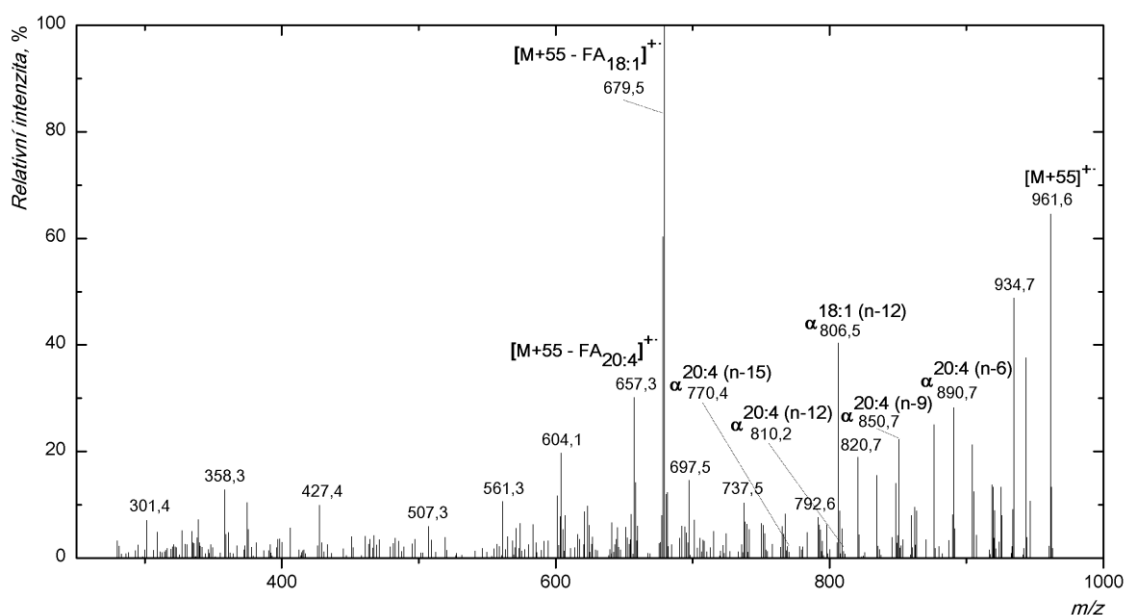
Příloha B34 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tripetroselininu a trialfa linolenin  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny petroselinové a dva acyly kyseliny alfa linolenové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,8 Da, kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra 5,24 a.u..



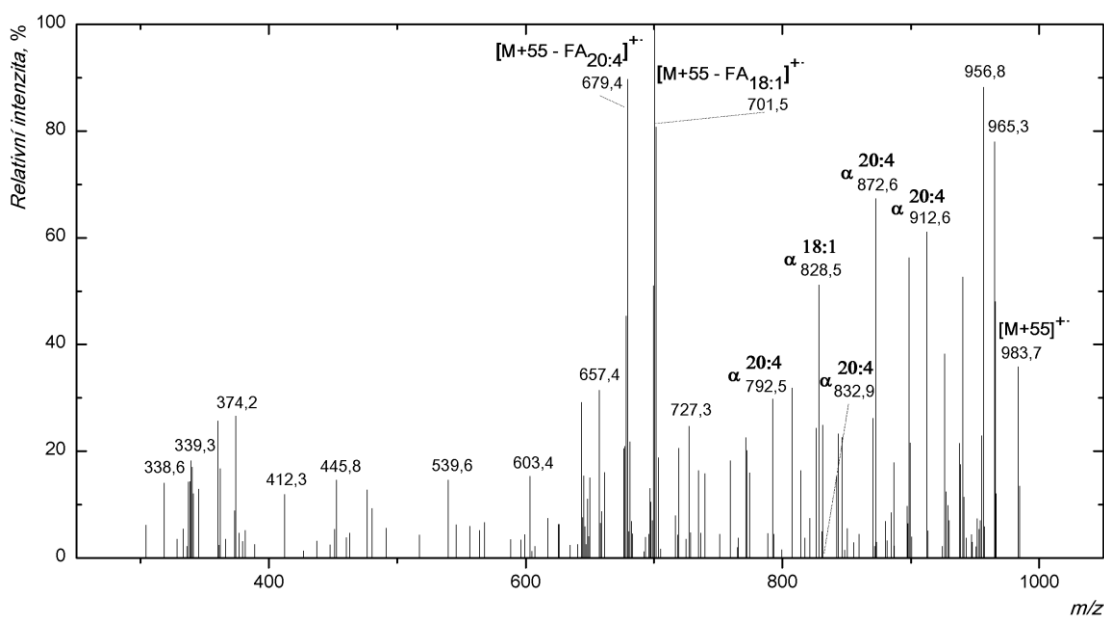
Příloha B35 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tripetroselininu a trigama linolenin  $[M+55]^{+}$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny alfa linolenové a dva acyly kyseliny petroselinové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 1,7 Da, kolizní energie činila 36,0 % a intenzita spektra 4,85 a.u..



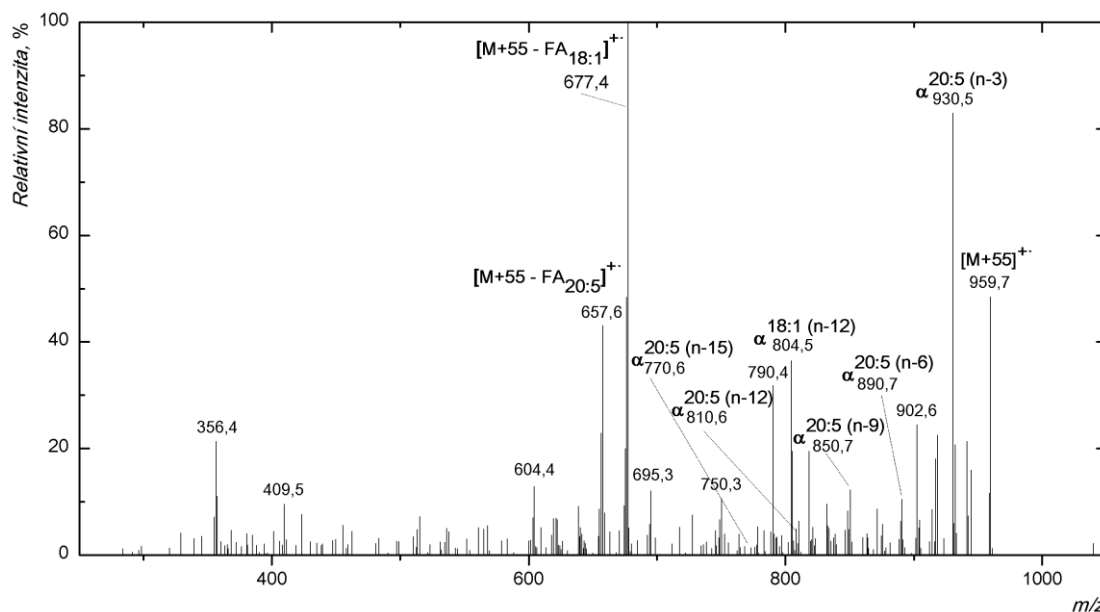
Příloha B36 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tripetroselininu a trigama linolenin  $[M+55]^{+}$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny petroselinové a dva acyly kyseliny gama linolenové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 1,7 Da, kolizní energie činila 36,5 % a intenzita spektra 2,67 a.u..



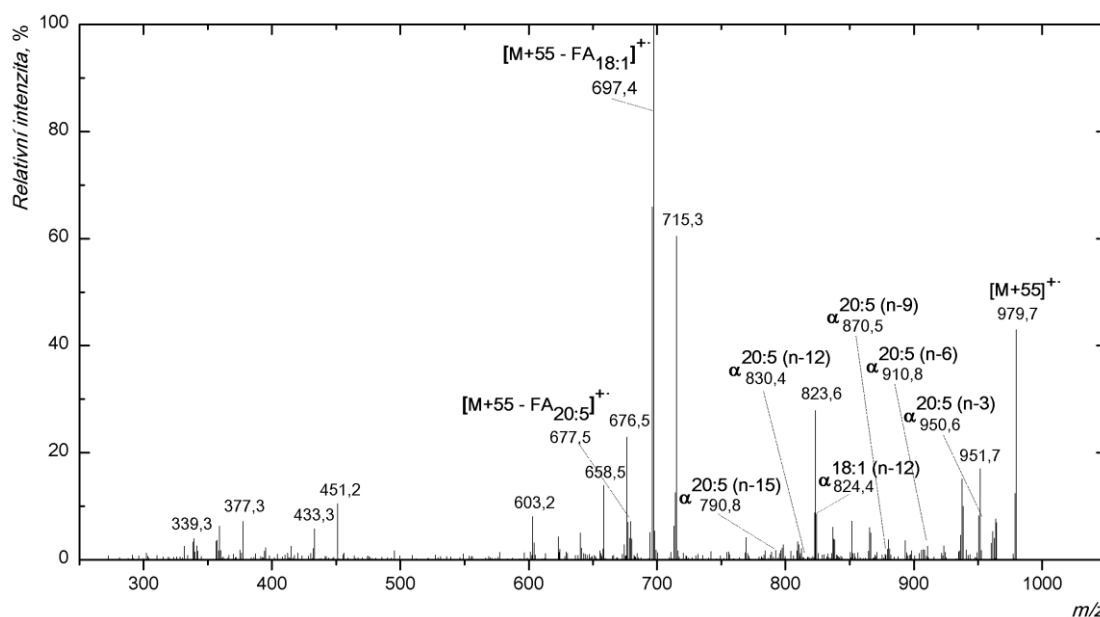
Příloha B37 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tripetroselininu a triarachidoninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny arachidonové a dva acyly kyseliny petroselinové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 1,5 Da, kolizní energie činila 35,5 % a intenzita spektra 1,69 a.u..



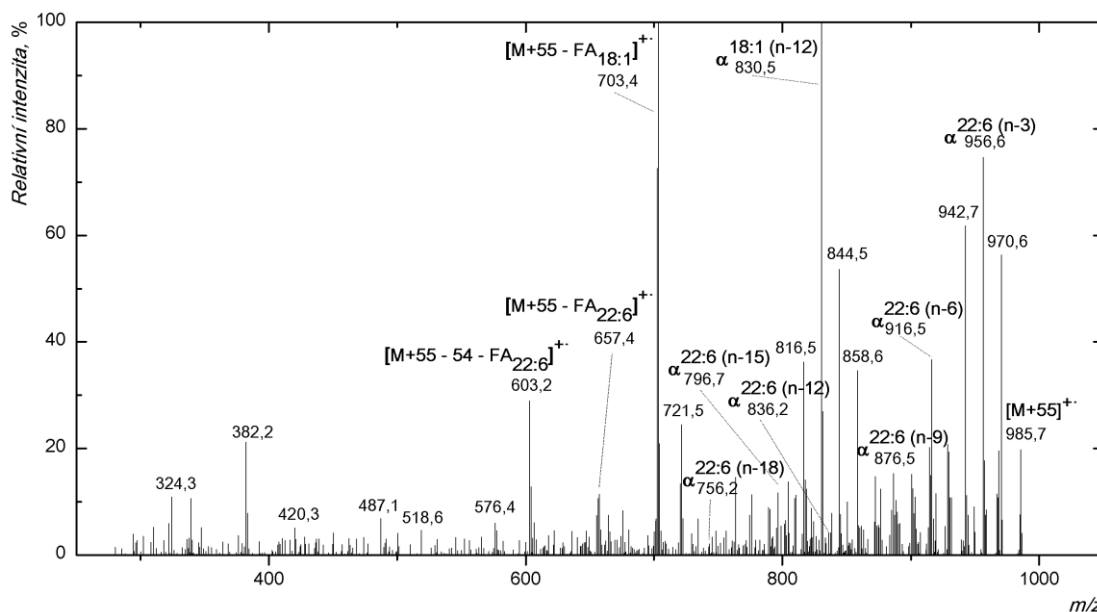
Příloha B38 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tripetroselininu a triarachidoninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny petroselinové a dva acyly kyseliny arachidonové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 35,5 % a intenzita spektra 1,31 a.u..



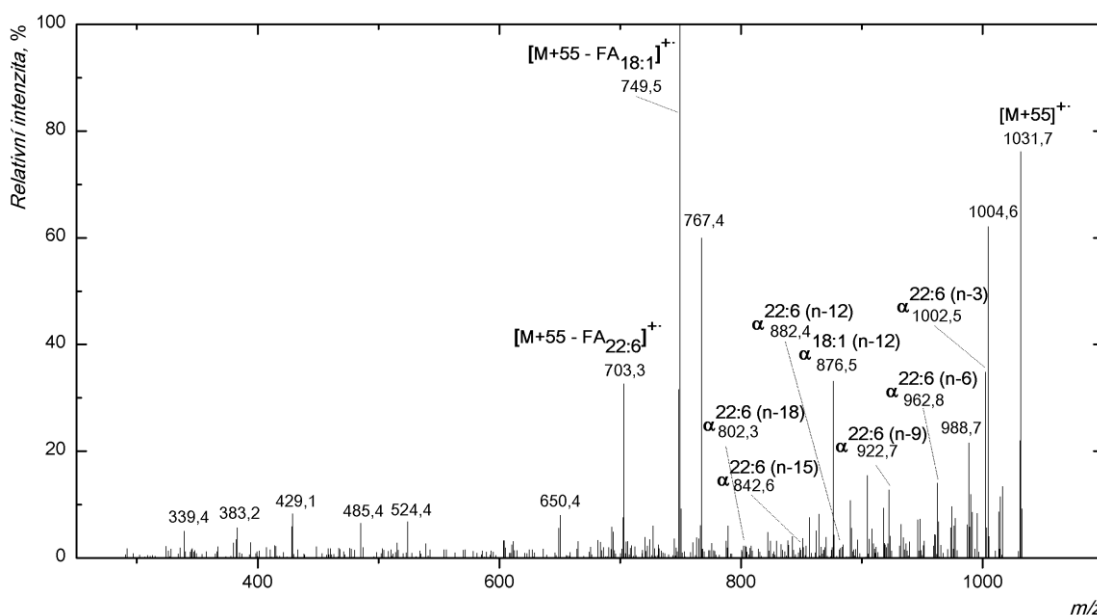
Příloha B39 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tripetroselininu a triekosapentaenoinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny eikosapentaenové a dva acyly kyseliny petroselinové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,4 Da, kolizní energie činila 33,5 % a intenzita spektra 2,12 a.u..



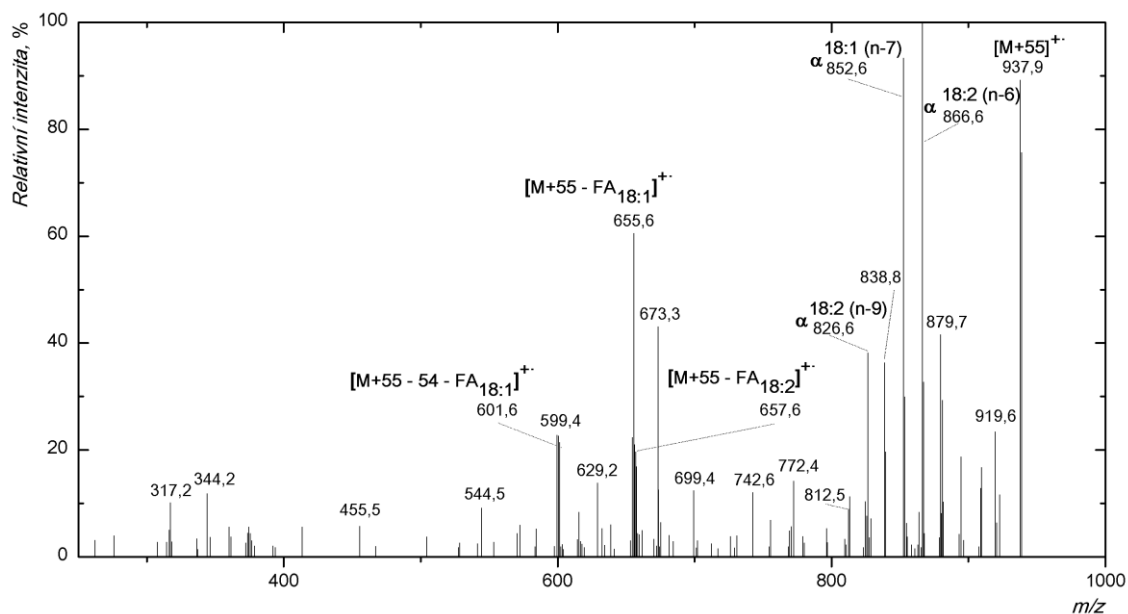
Příloha B40 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tripetroselininu a triekosapentaenoinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny petroselinové a dva acyly kyseliny eikosapentaenové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,8 Da, kolizní energie činila 34,5 % a intenzita spektra  $1,05 \cdot 10^1$  a.u..



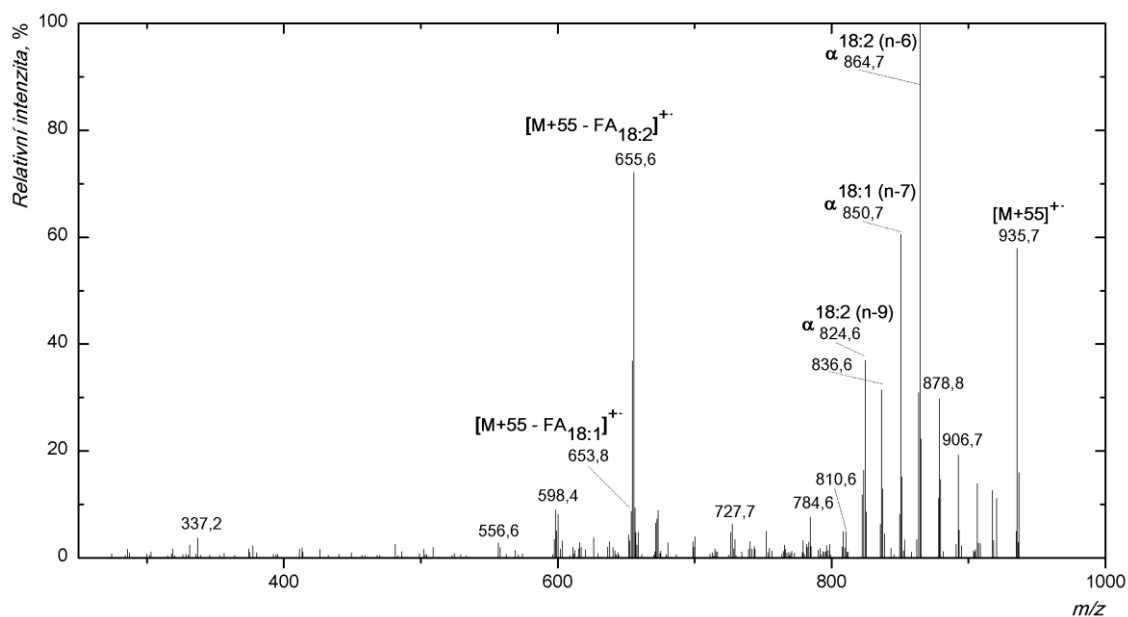
Příloha B41 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tripetroselininu a tridokosaheptaenoinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny dokosaheptaenové a dva acyl kyseliny petroselinové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,8 Da, kolizní energie činila 35,5 % a intenzita spektra 1,82 a.u..



Příloha B42 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi tripetroselininu a tridokosaheptaenoinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny petroselinové a jeden acyl kyseliny dokosaheptaenové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 34,5 % a intenzita spektra 2,65 a.u..

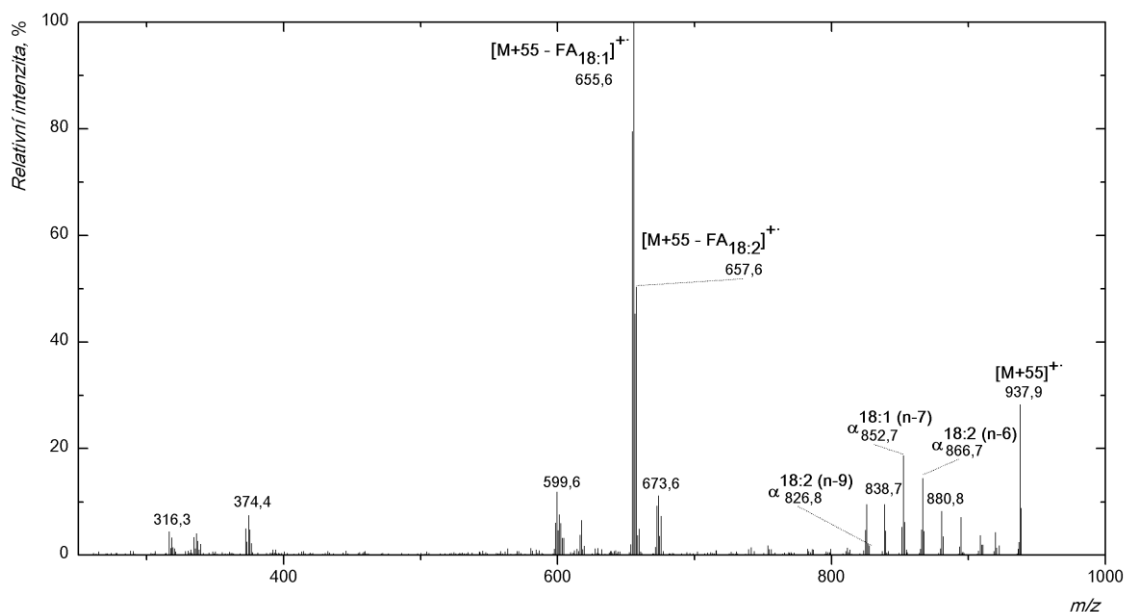


Příloha B43 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trivacceninu a trilinoleinu  $[M+55]^{+\cdot}$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny linolové a dva acyly kyseliny vakcenové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra  $3,51 \cdot 10^{-1}$  a.u..

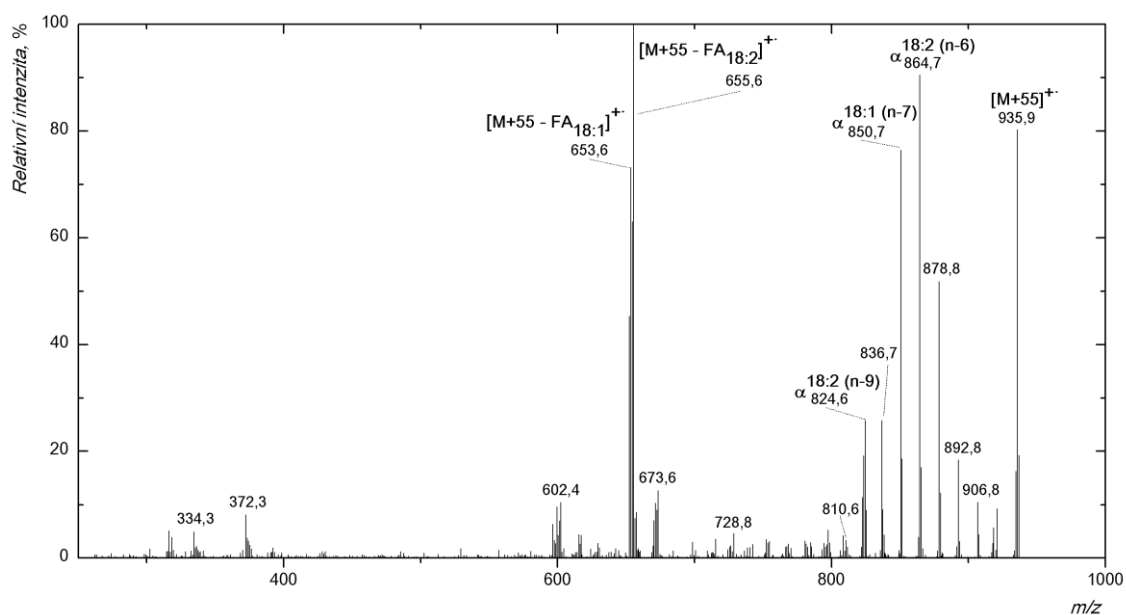


Příloha B44 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trivacceninu a trilinoleinu  $[M+55]^{+\cdot}$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny vakcenové a dva acyly kyseliny linolové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,3 Da, kolizní energie činila 33,0 % a intenzita spektra 1,06 a.u..

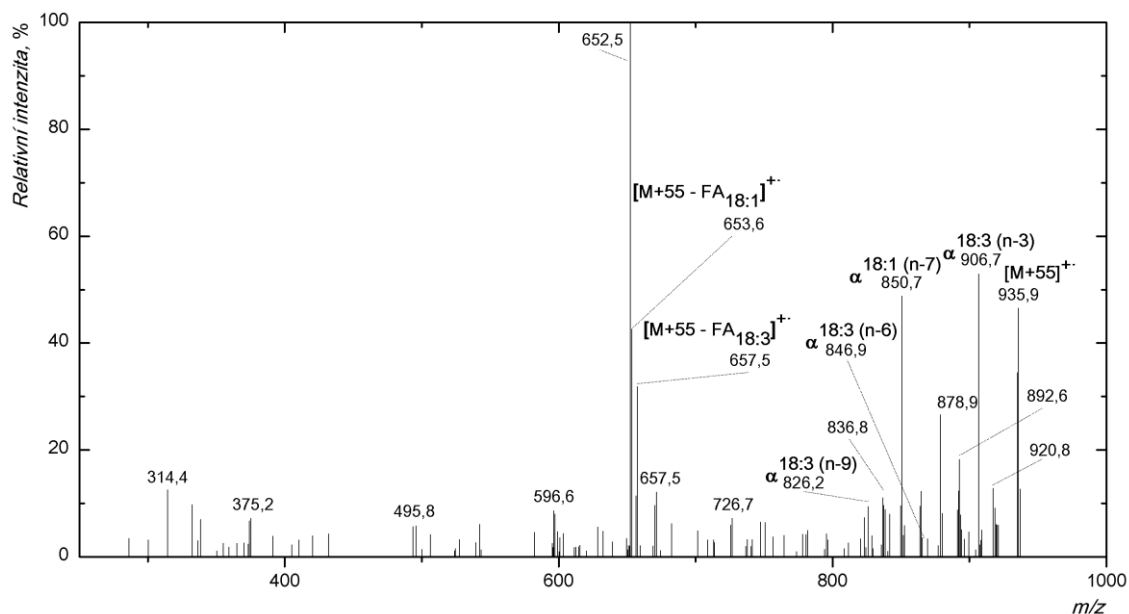




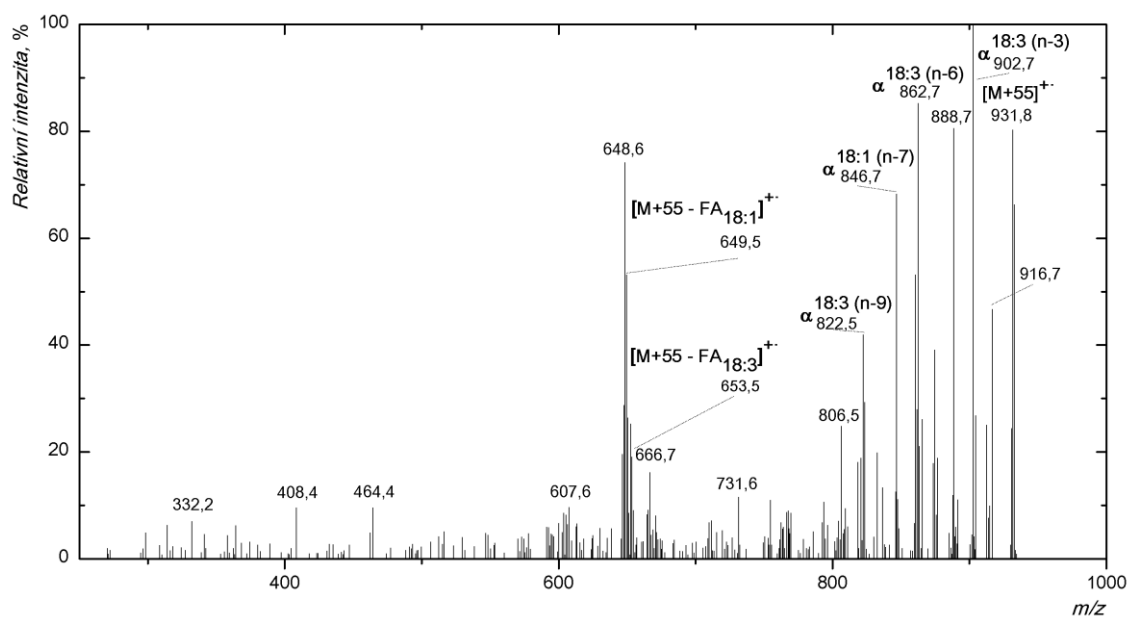
Příloha B45 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trivaceninu a trilinoelaidinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny linoelaidinové a dva acyly kyseliny vakcenové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 38,0 % a intenzita spektra 5,04 a.u..



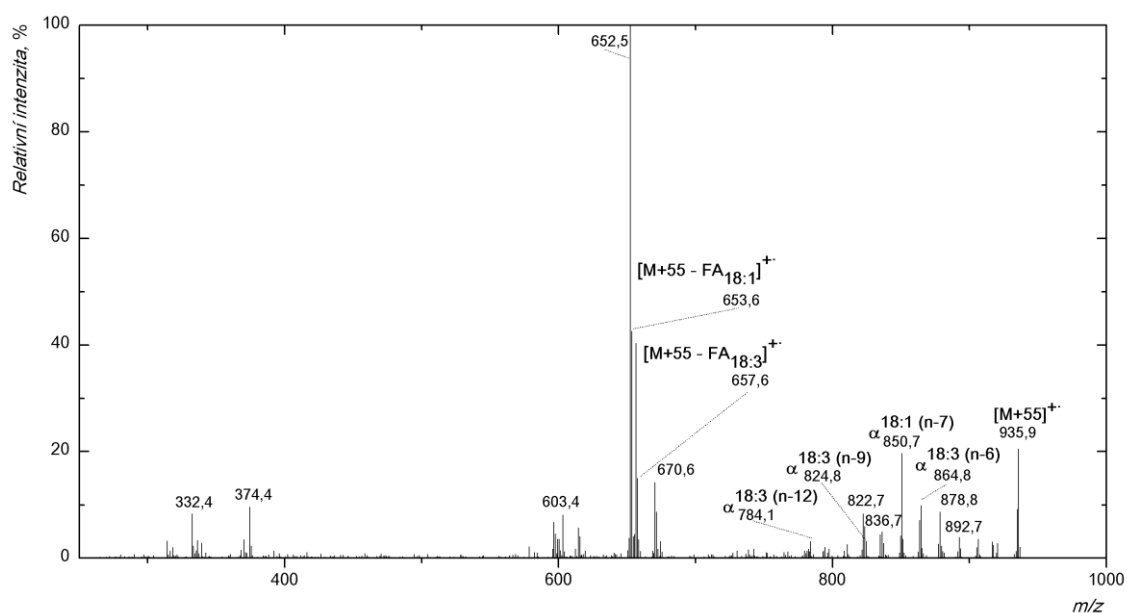
Příloha B46 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trivacceninů a trilinoelaidinů  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny vakcenové a dva acyly kyseliny linoelaidinové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 37,0 % a intenzita spektra 6,41 a.u..



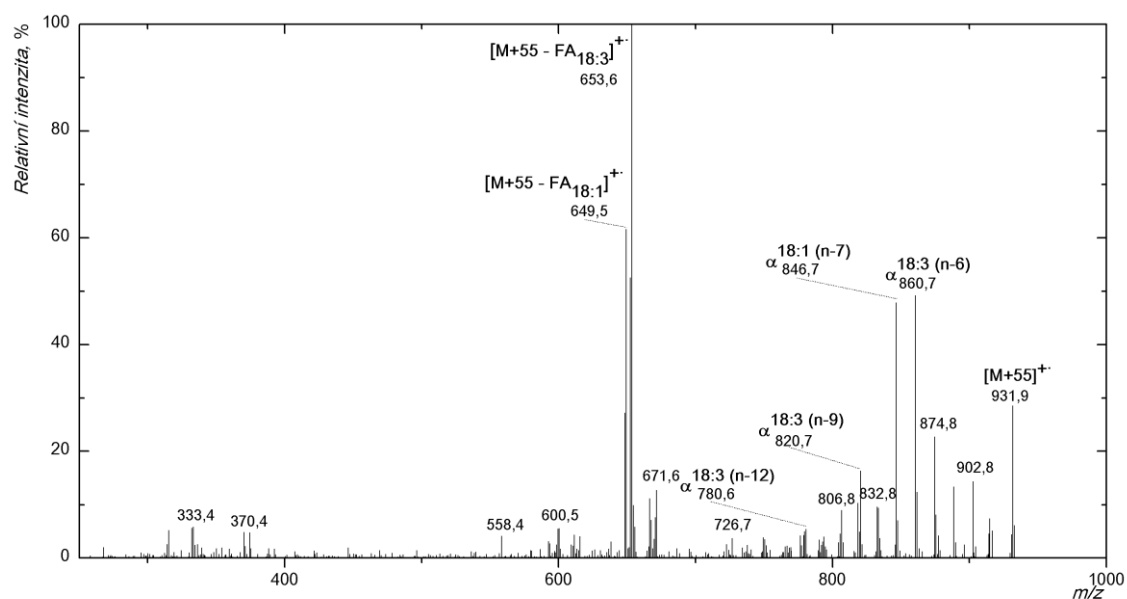
Příloha B47 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trivacceninu a trialfa linoleninu  $[M+55]^{++}$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny alfa linolenové a dva acyly kyseliny vaccenové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,8 Da, kolizní energie činila 35,0 % a intenzita spektra 1,29 a.u..



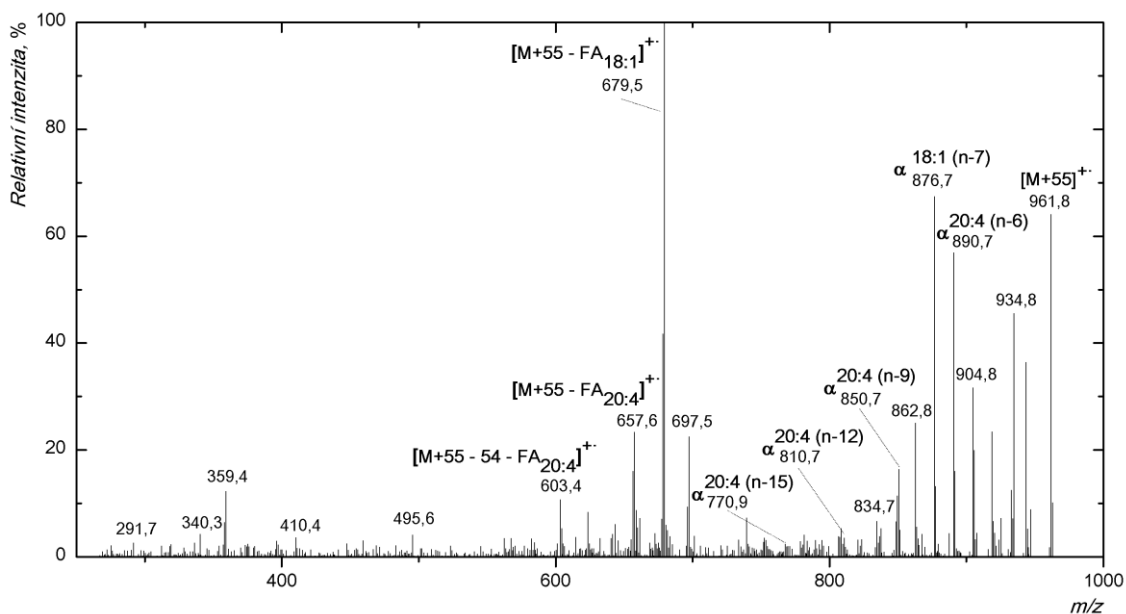
Příloha B48 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trivacceninu a trialfa linoleninu  $[M+55]^{++}$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny vaccenové a dva acyly kyseliny alfa linolenové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 2,0 Da a kolizní energie činila 35,0 % a intenzita spektra  $4,11 \cdot 10^{-1}$  a.u..



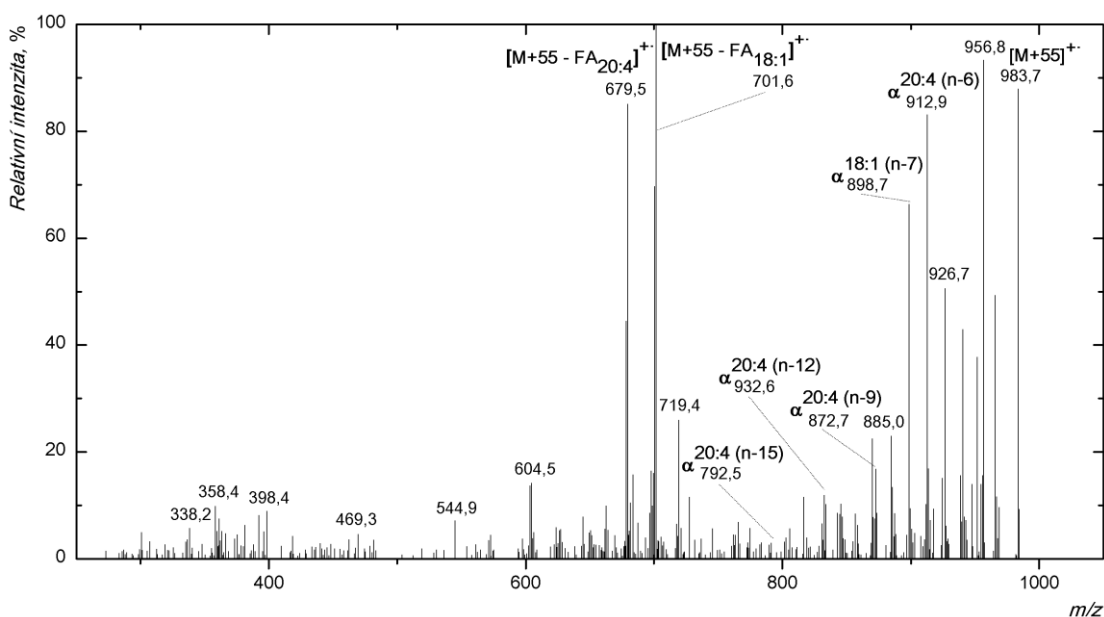
Příloha B49 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trivacenin a trigama linoleninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny gama linolenové a dva acyly kyseliny vakcenové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 1,8 Da, kolizní energie činila 36,0 % a intenzita spektra  $1,30 \cdot 10^1$  a.u..



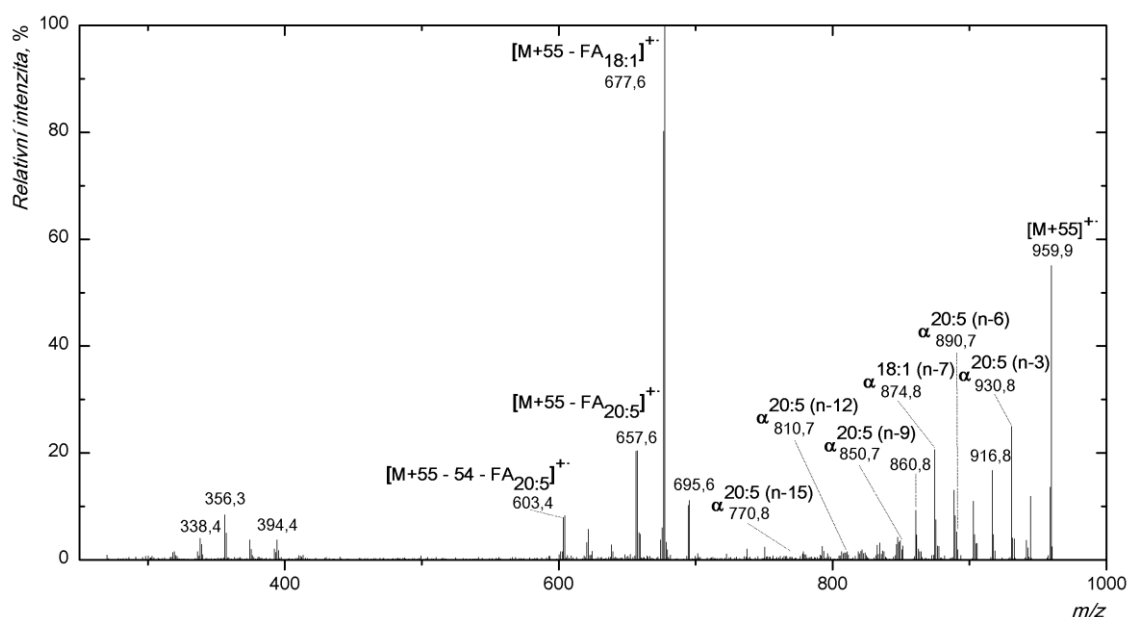
Příloha B50 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trivacenin a trigama linoleninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny vakcenové a dva acyly kyseliny gama linolenové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 1,7 Da, kolizní energie činila 36,0 % a intenzita spektra 3,05 a.u..



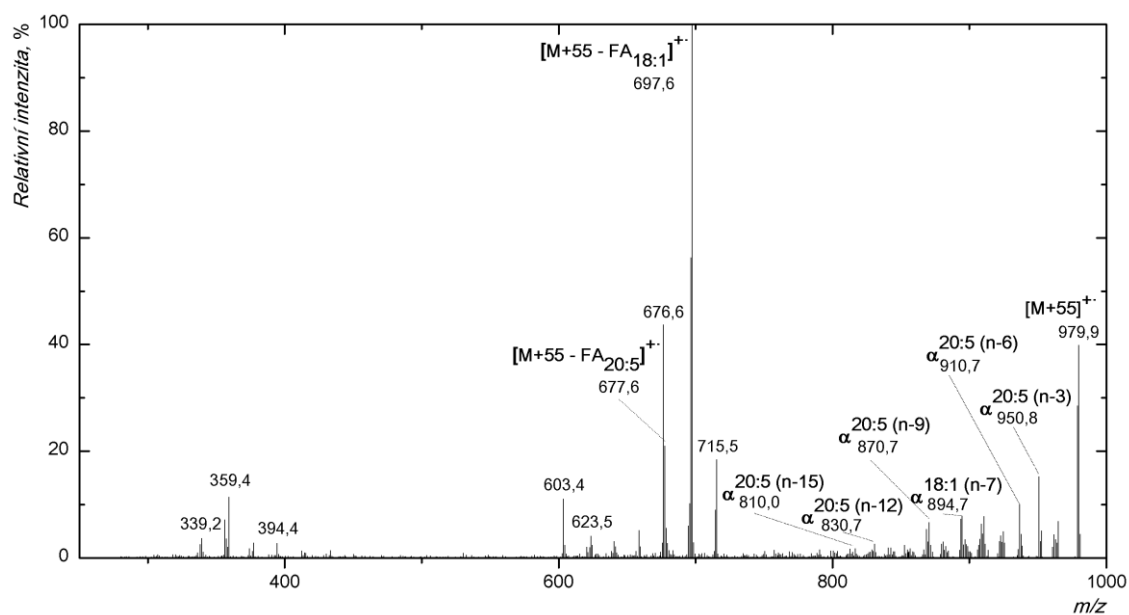
Příloha B51 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trivacceninu a triarachidoninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny arachidonové a dva acyly kyseliny vakcenové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 36,0 % a intenzita spektra 1,56 a.u..



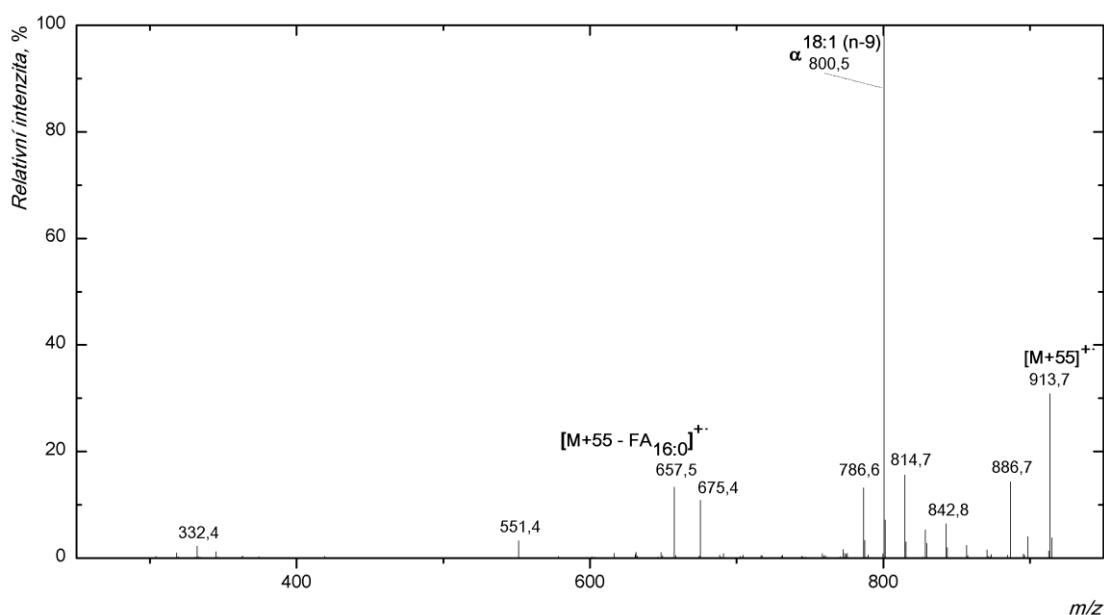
Příloha B52 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trivacceninu a triarachidoninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny vakcenové a dva acyly kyseliny arachidonové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 35,0 % a intenzita spektra 1,02 a.u..



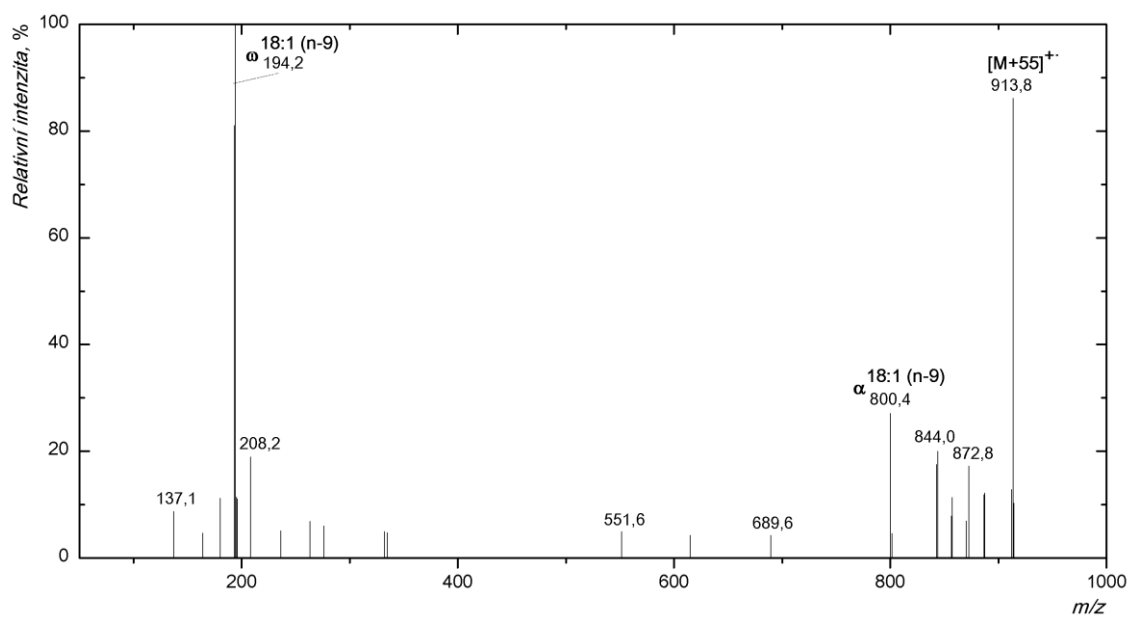
Příloha B53 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trivacenin a triekosapentaenoinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny eikosapentaenové a dva acyly kyseliny vakcenové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,5 Da, kolizní energie činila 36,5 % a intenzita spektra 9,50 a.u..



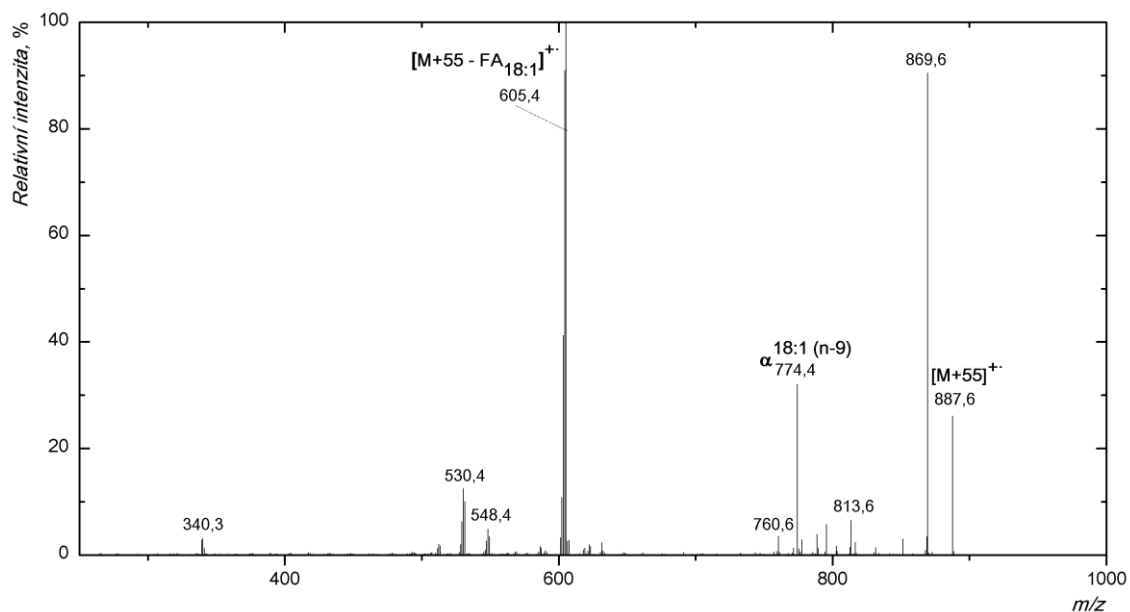
Příloha B54 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trivacenin a triekosapentaenoinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny vakcenové a dva acyly kyseliny eikosapentaenové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,9 Da, kolizní energie činila 36,0 % a intenzita spektra  $1,64 \cdot 10^1$  a.u..



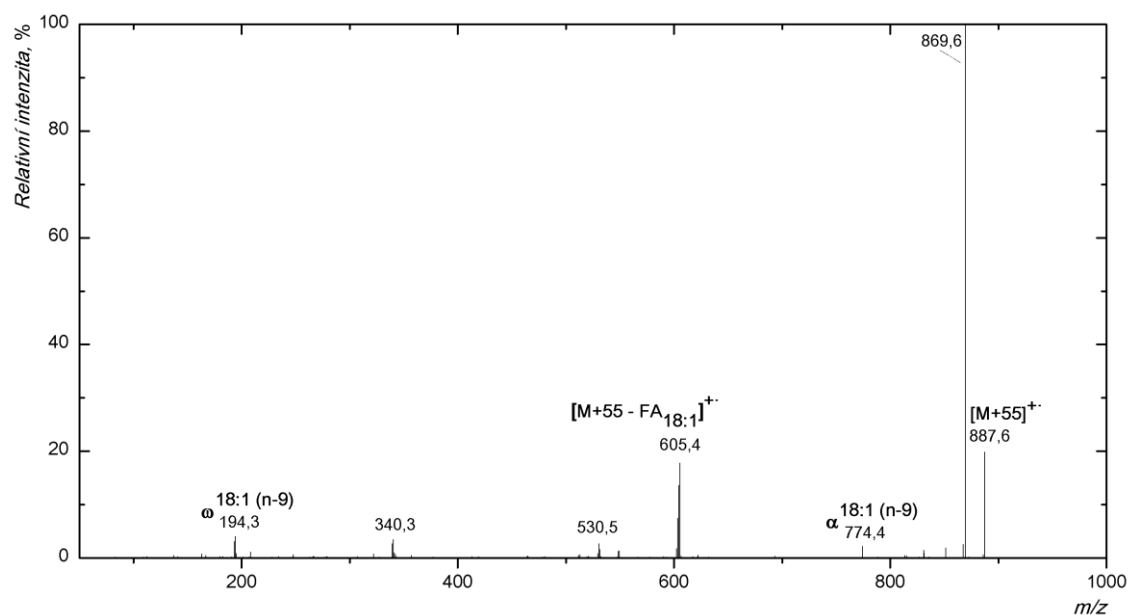
Příloha B55 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trioleinu a tripalmitinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny palmitové a dva acyly kyseliny olejové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 2,0 Da, kolizní energie činila 29,0 % a intenzita spektra  $2,09 \cdot 10^1$  a.u..



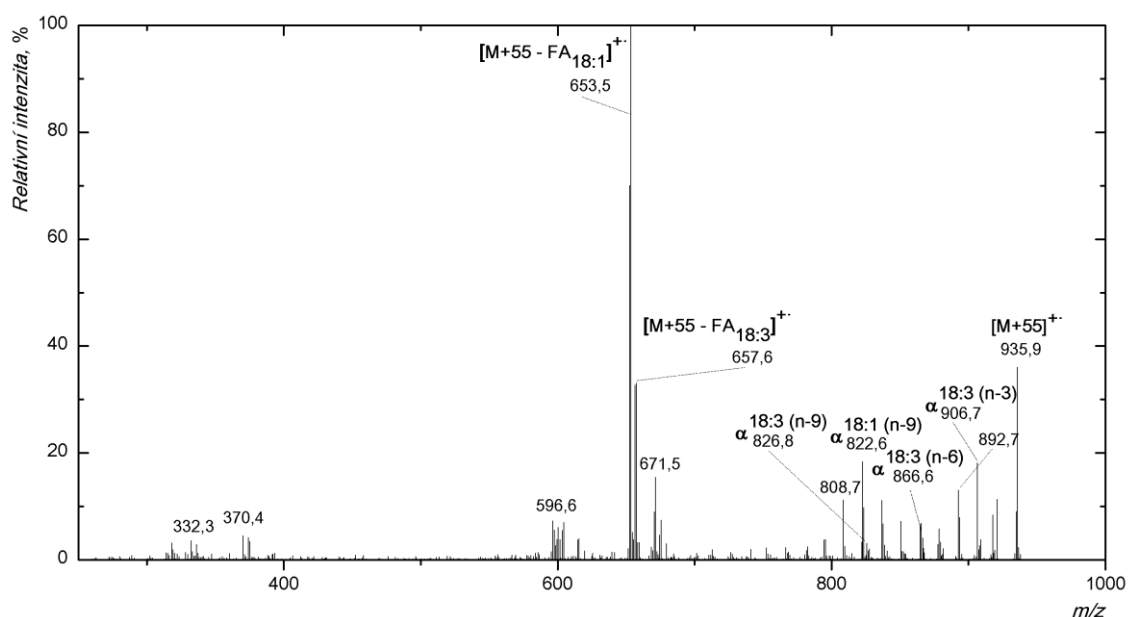
Příloha B56 APCI-MS/MS spektrum (PQD) aduktu randomizační směsi trioleinu a tripalmitinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny palmitové a dva acyly kyseliny olejové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 2,0 Da, kolizní energie činila 31,5 % a intenzita spektra  $1,47 \cdot 10^{-1}$  a.u..



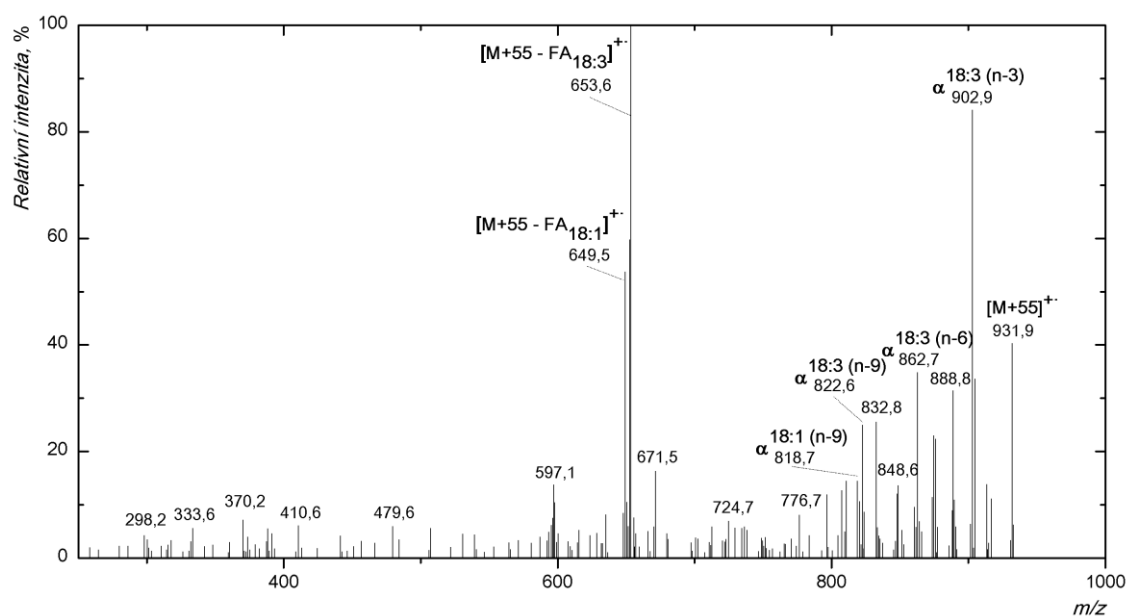
Příloha B57 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trioleinu a tripalmitinu  $[M+55]^+ \cdot TG$  obsahuje jeden acyl kyseliny olejové a dva acyly kyseliny palmitové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu l/min$ , šířka izolačního okna 1,7 Da, kolizní energie činila 28,0 % a intenzita spektra  $5,80 \cdot 10^1$  a.u..



Příloha B58 APCI-MS/MS spektrum (PQD) aduktu randomizační směsi trioleinu a tripalmitinu  $[M+55]^+ \cdot TG$  obsahuje jeden acyl kyseliny olejové a dva acyly kyseliny palmitové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu l/min$ , šířka izolačního okna 1,7 Da, kolizní energie činila 31,0 % a intenzita spektra 1,51 a.u..

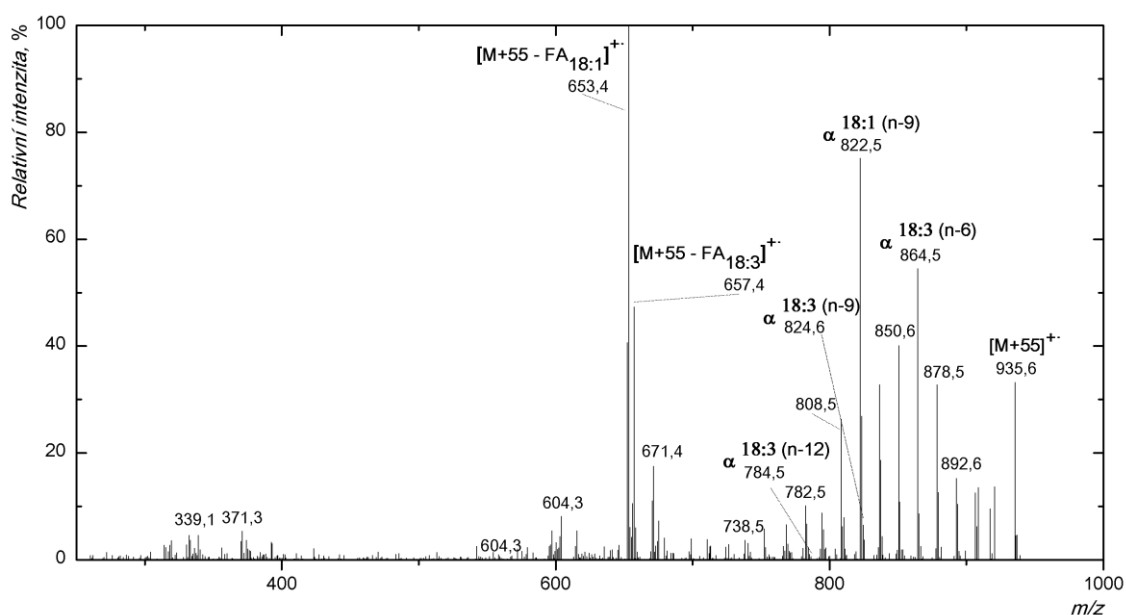


Příloha B59 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trioleinu a trialfa linoleninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny alfa linolenové a dva acyly kyseliny olejové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 1,5 Da, kolizní energie činila 36,0 % a intenzita spektra 3,28 a.u..

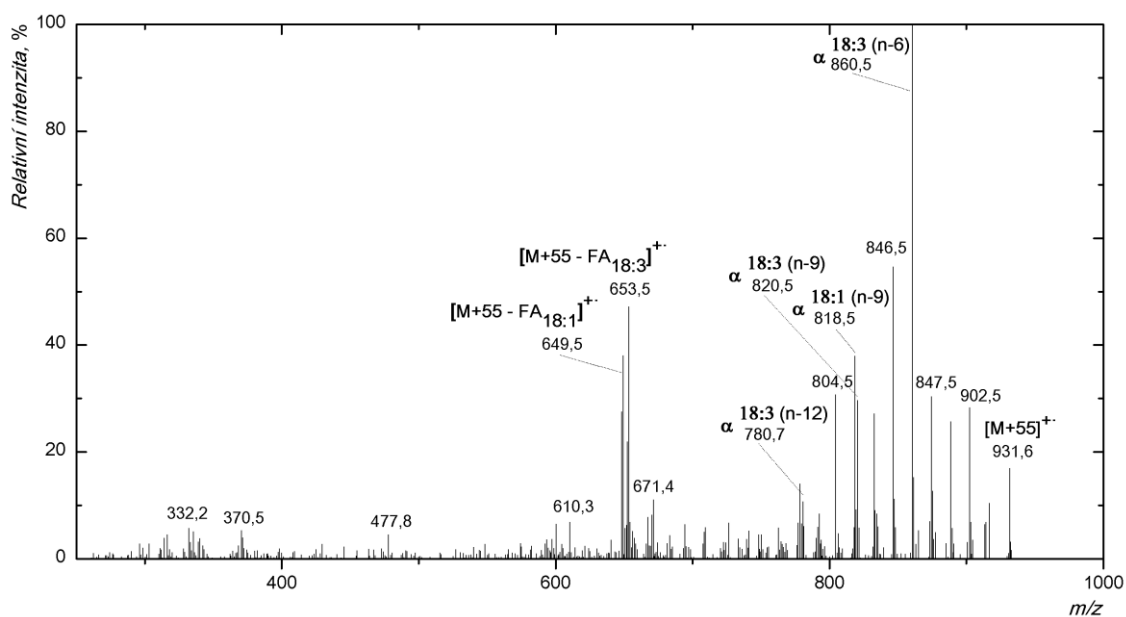


Příloha B60 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trioleinu a trialfa linoleninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny olejové a dva acyly kyseliny alfa linolenové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 1,2 Da, kolizní energie činila 35,5 % a intenzita spektra 1,17 a.u..

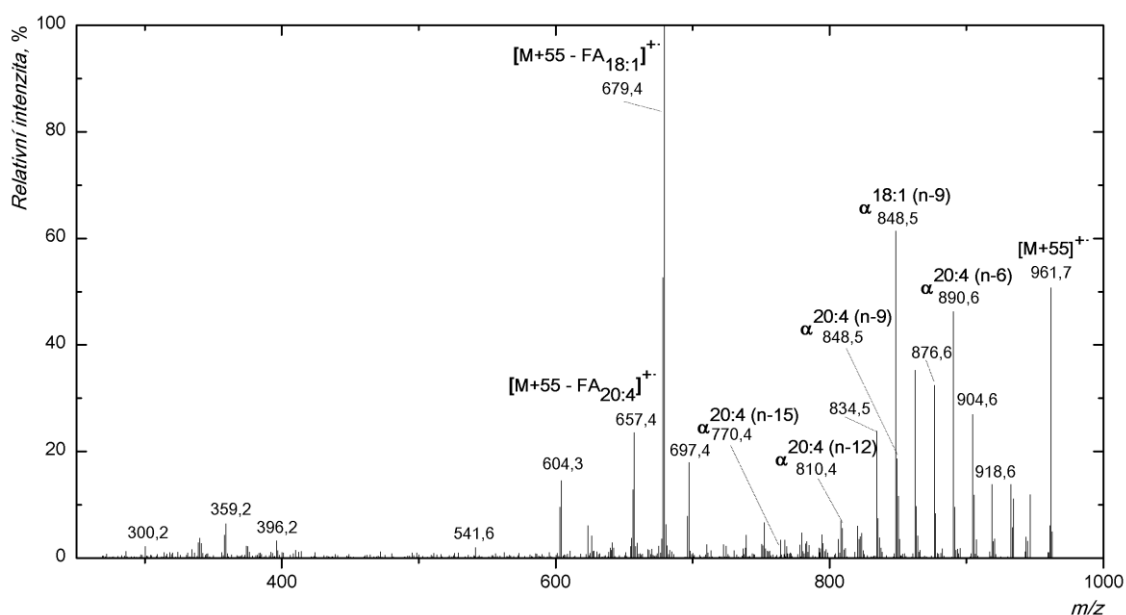




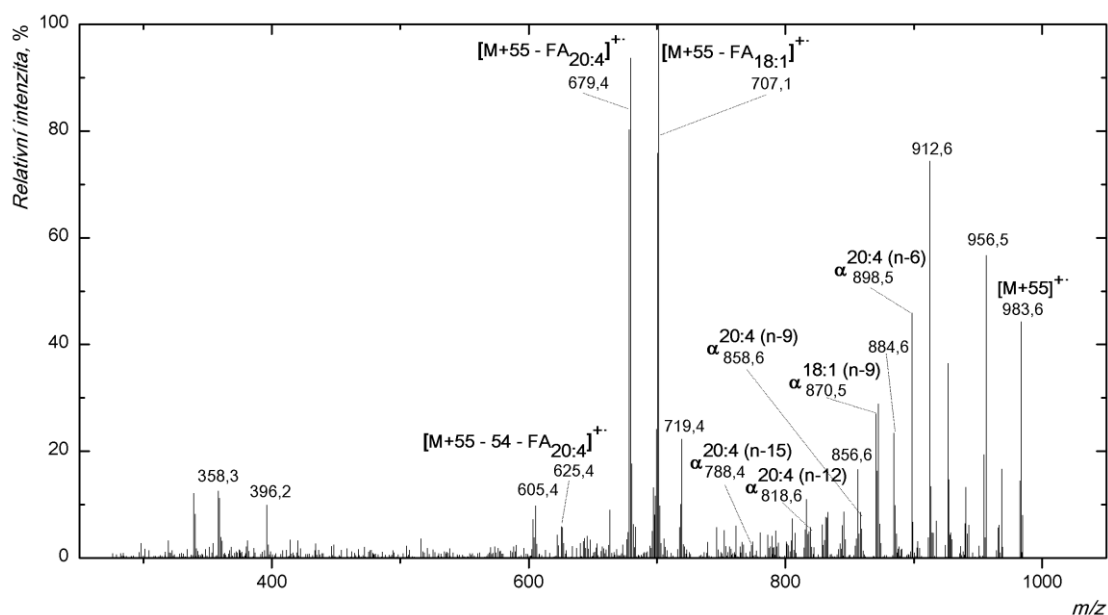
Příloha B61 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trioleinu a trigama linoleninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny gama linolenové a dva acyly kyseliny olejové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 35,0 % a intenzita spektra 6,13 a.u..



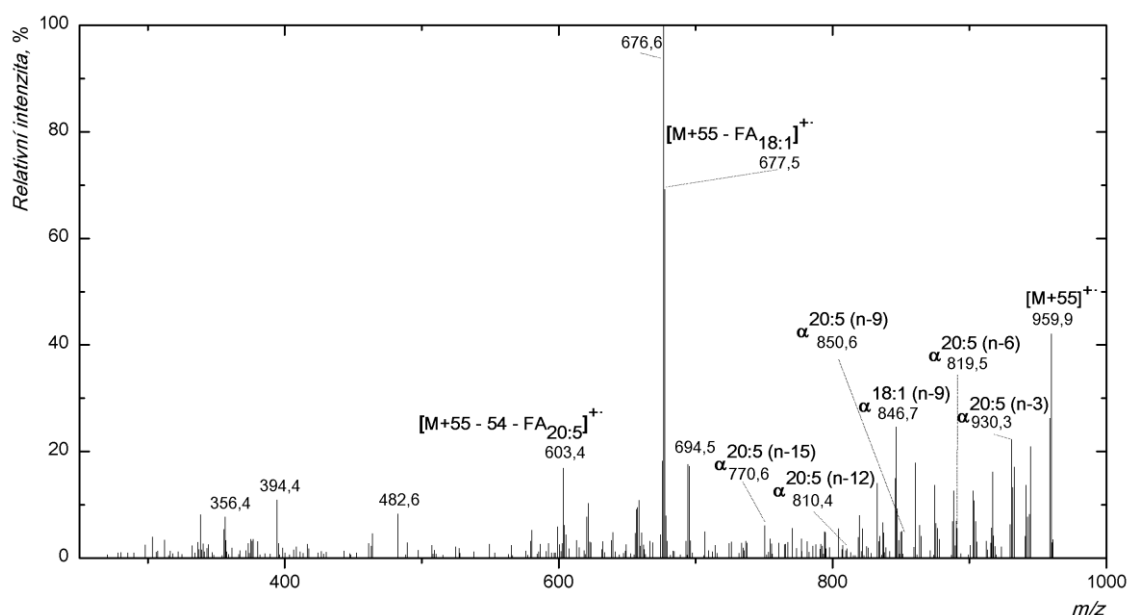
Příloha B62 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trioleinu a trigama linoleninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny olejové a dva acyly kyseliny gama linolenové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 35,0 % a intenzita spektra 4,37 a.u..



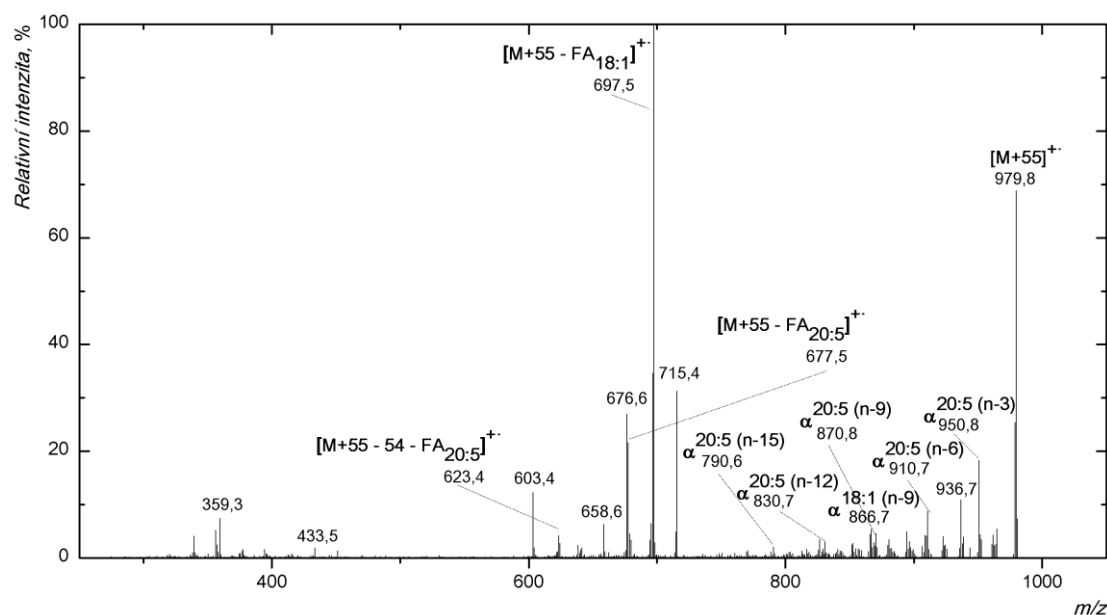
Příloha B63 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trioleinu a triarachidoninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny arachidonové a dva acyly kyseliny olejové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 33,5 % a intenzita spektra  $1,28 \cdot 10^1$  a.u..



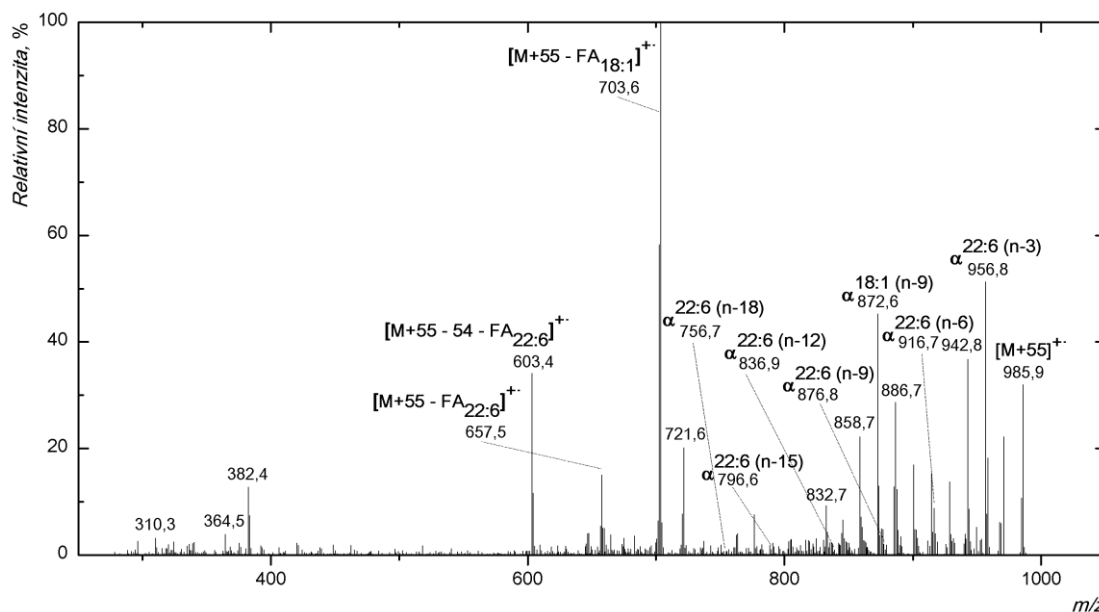
Příloha B64 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trioleinu a triarachidoninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny olejové a dva acyly kyseliny arachidonové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 1,8 Da, kolizní energie činila 34,5 % a intenzita spektra 5,52 a.u..



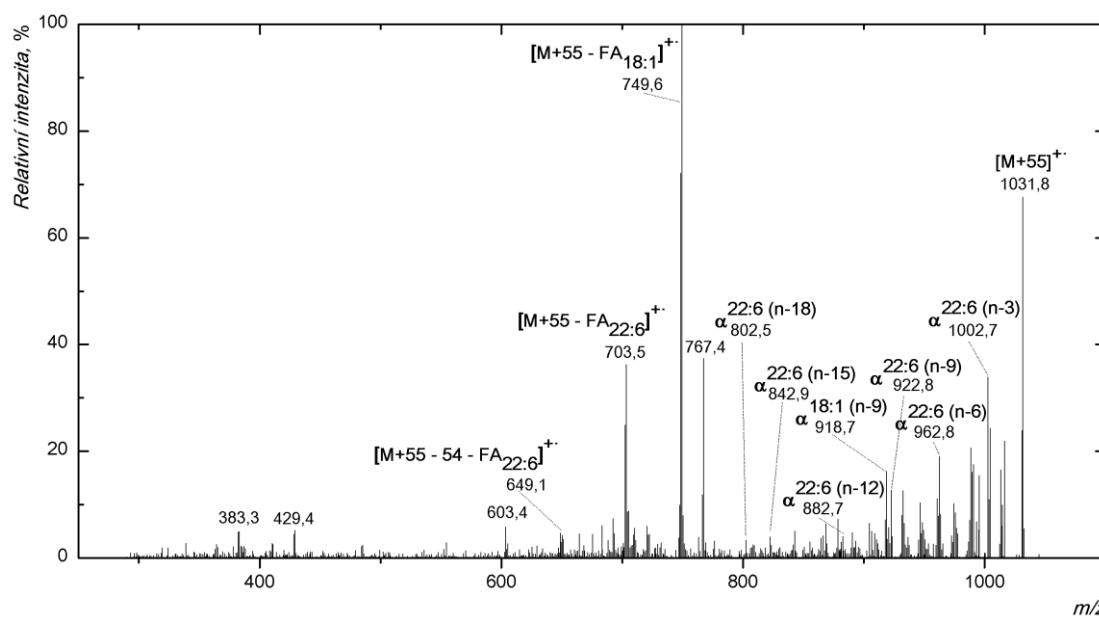
Příloha B65 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trioleinu a triekosapentaenoinu  $[M+55]^{+-}$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny eikosapentaenoinové a dva acyly kyseliny olejové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,8 Da, kolizní energie činila 35,5 % a intenzita spektra 1,35 a.u..



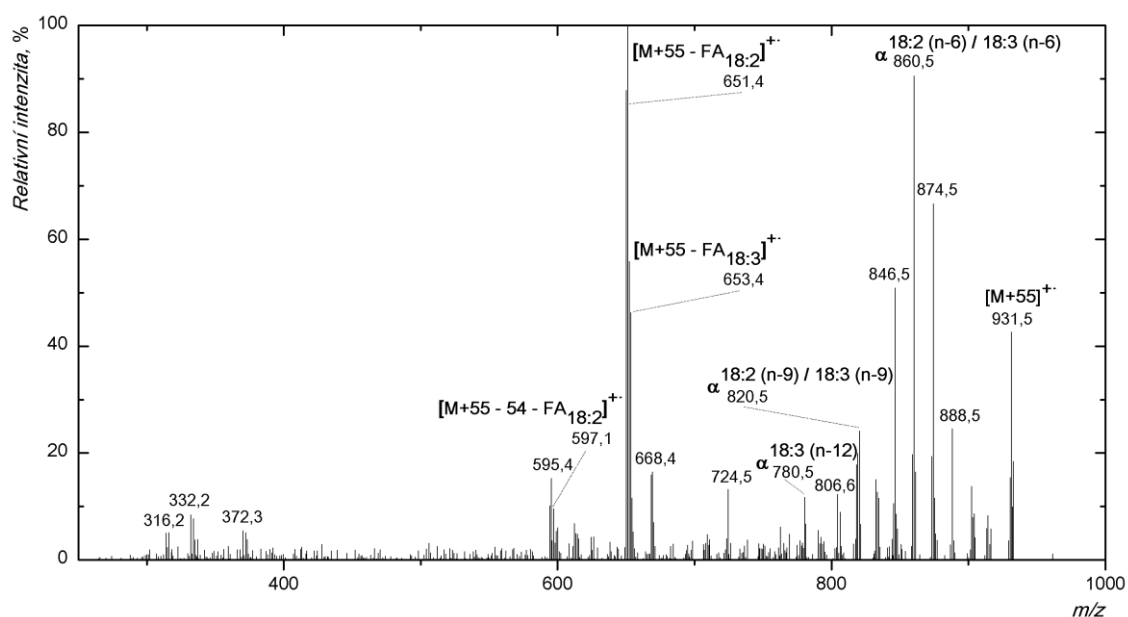
Příloha B66 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trioleinu a triekosapentaenoinu  $[M+55]^{+-}$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny olejové a dva acyly kyseliny eikosapentaenoinové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,9 Da, kolizní energie činila 34,5 % a intenzita spektra  $1,46 \cdot 10^1$  a.u..



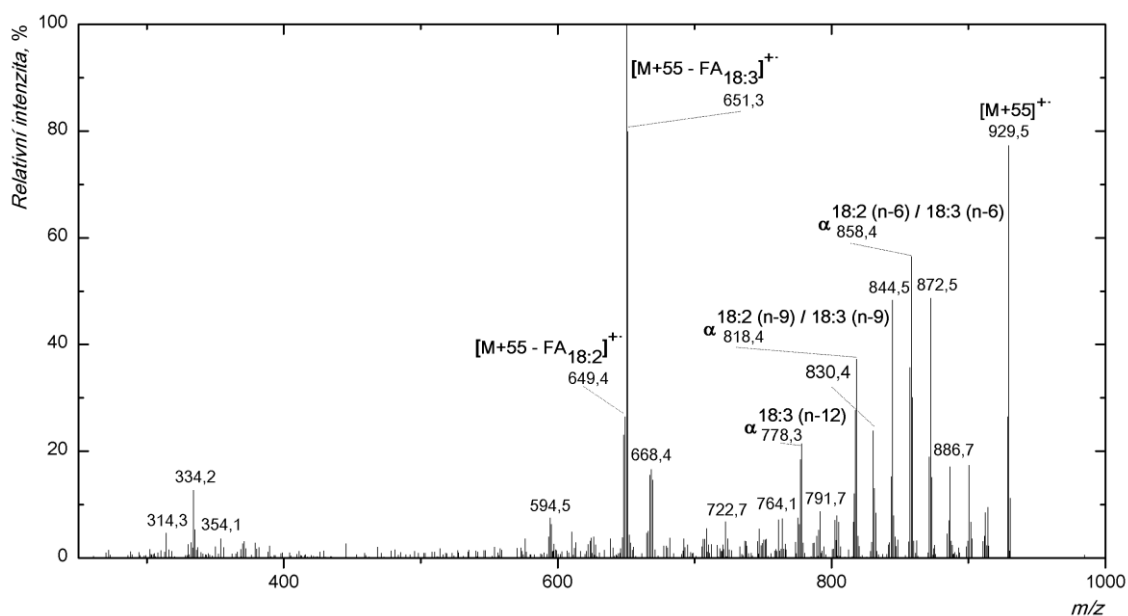
Příloha B67 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trioleinu a tridokosahehexaenoinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny dokosahehexaenovy a dva acyl kyseliny olejové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 35,0 % a intenzita spektra 2,62 a.u..



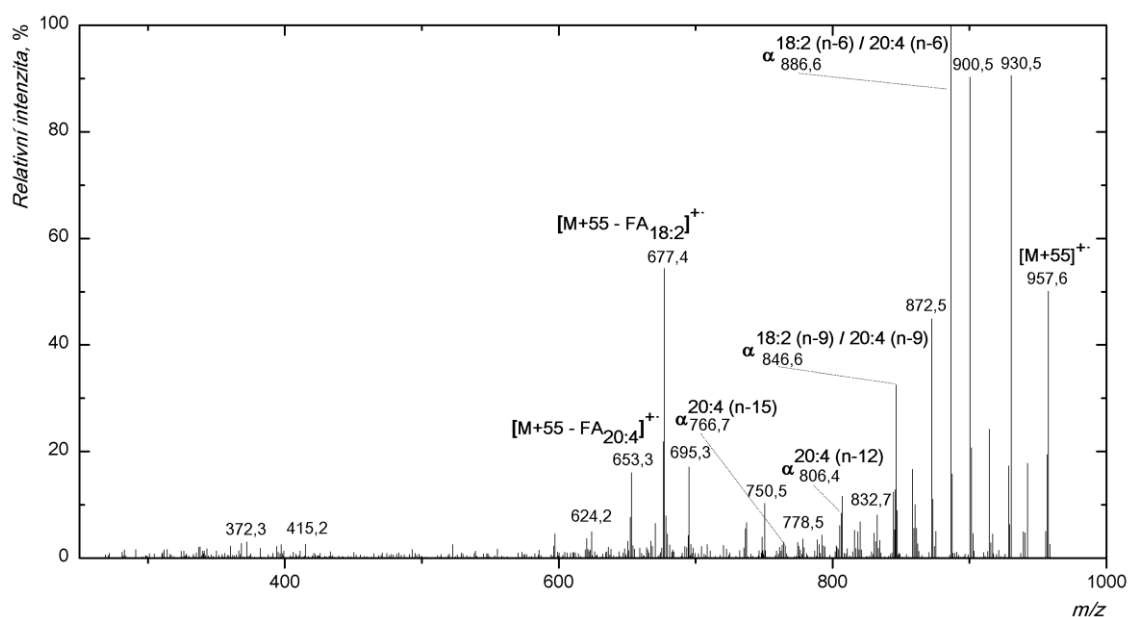
Příloha B68 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trioleinu a tridokosahehexaenoinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny olejové a dva acyl kyseliny dokosahehexaenové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,7 Da, kolizní energie činila 35,0 % a intenzita spektra 2,64 a.u..



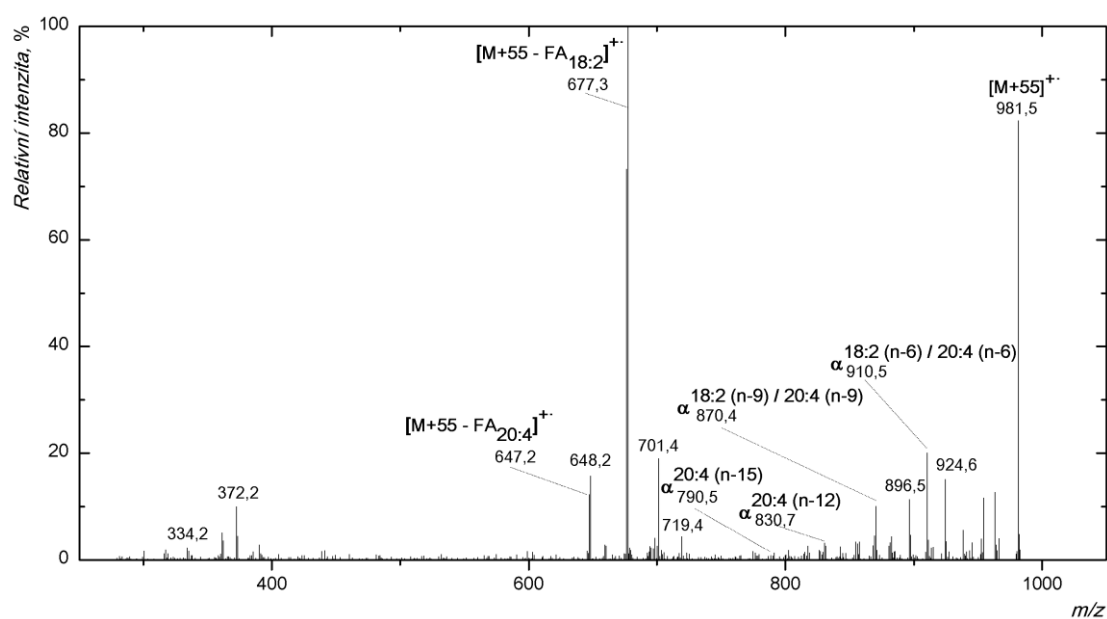
Příloha B69 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trilinoleinu a trigama linoleninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny gama linolenové a dva acyly kyseliny linolenové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,7 Da, kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra 4,09 a.u..



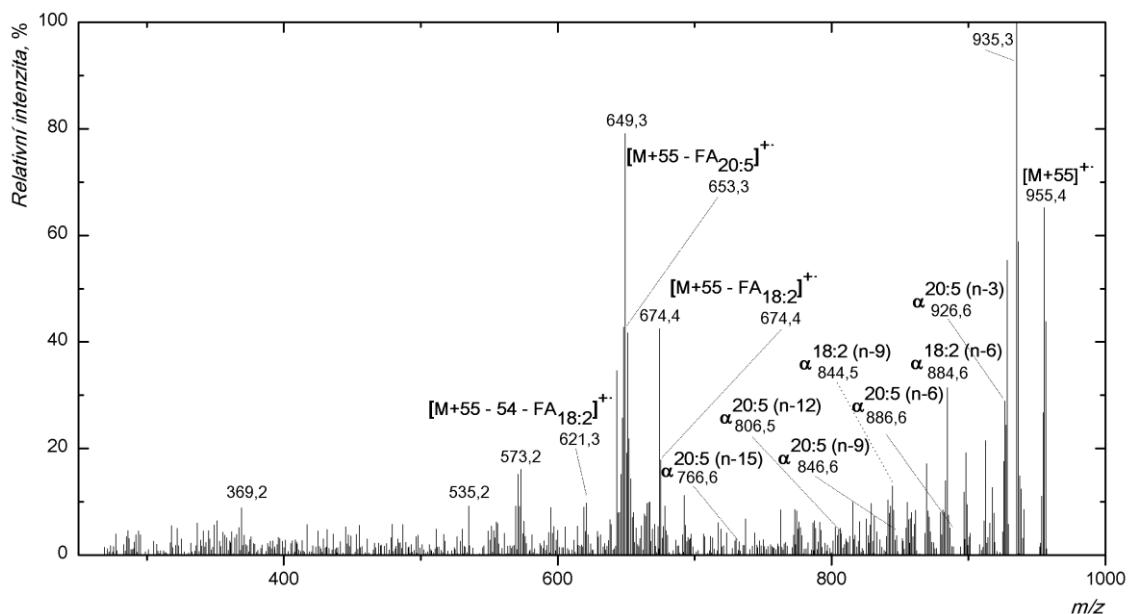
Příloha B70 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trilinoleinu a trigama linoleninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny linolenové a dva acyly kyseliny gama linolenové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,8 Da, kolizní energie činila 32,5 % a intenzita spektra 4,04 a.u..



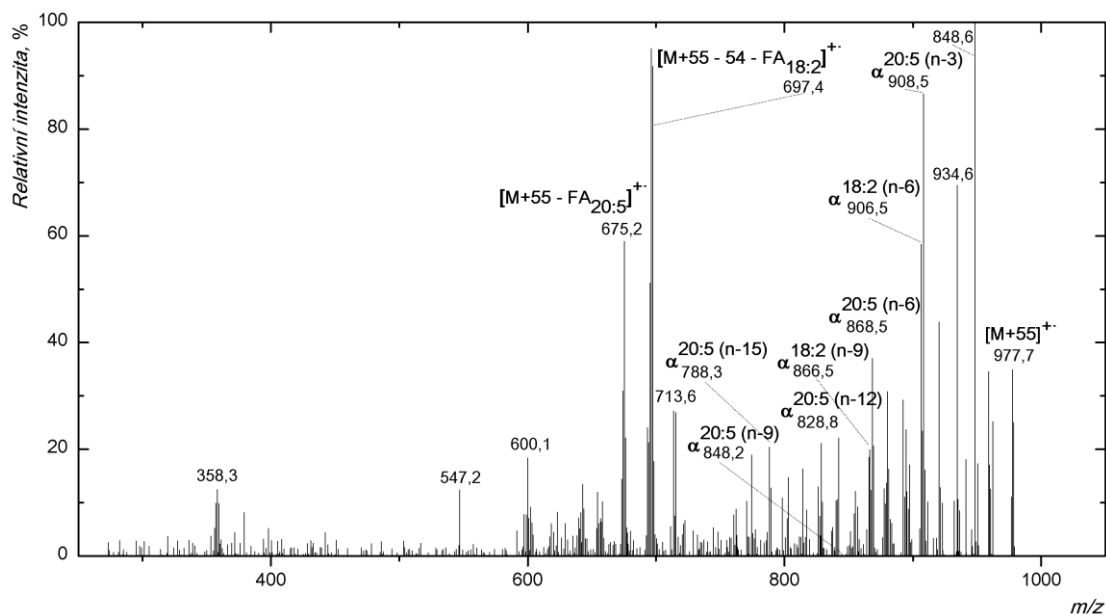
Příloha B71 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trilinoleinu a triarachidoninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny arachidonové a dva acyly kyseliny linolové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 32,5 % a intenzita spektra 9,23 a.u..



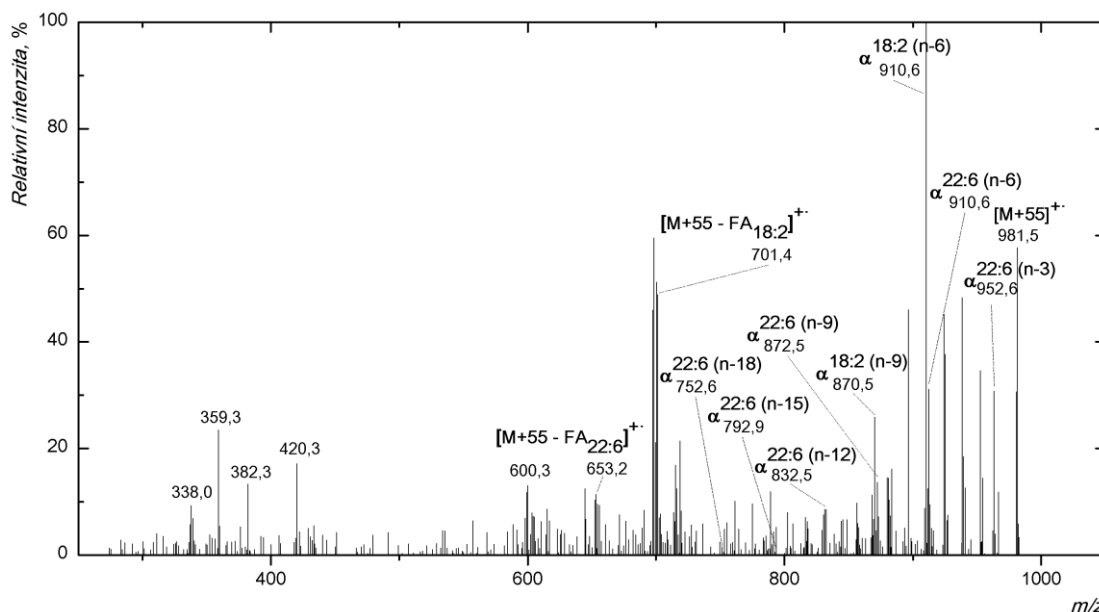
Příloha B72 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trilinoleinu a triarachidoninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny linolové a dva acyly kyseliny arachidonové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,8 Da, kolizní energie činila 32,0 % a intenzita spektra 8,76 a.u..



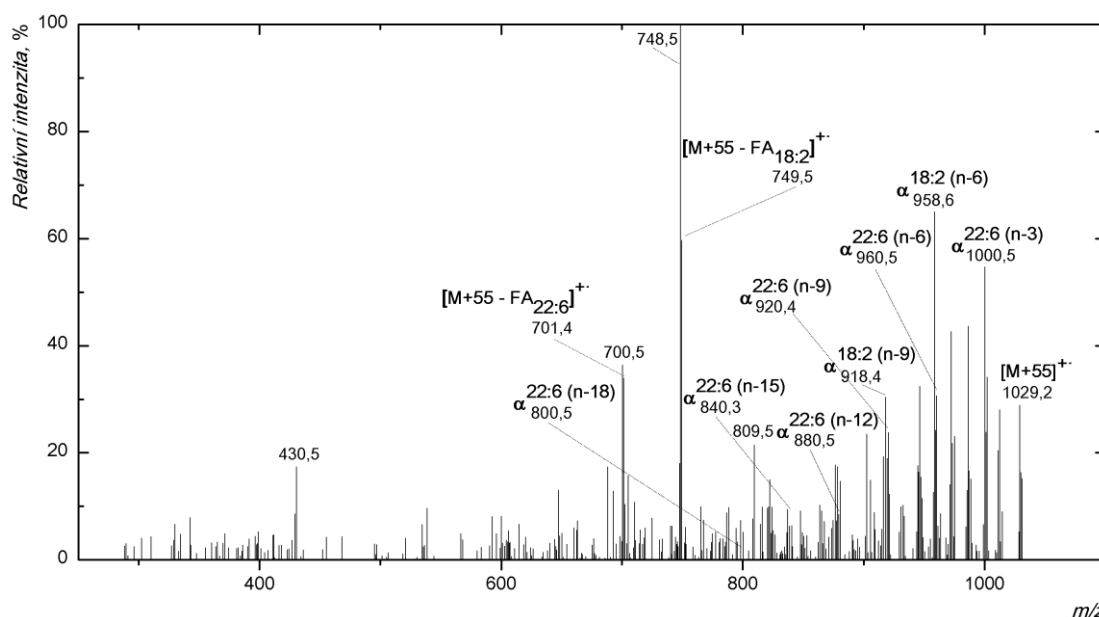
Příloha B73 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trilinoleinu a triekosapentaenoinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny eikosapentaenové a dva acyly kyseliny linolové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 2,4 Da, kolizní energie činila 32,5 % a intenzita spektra 4,66 a.u..



Příloha B74 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trilinoleinu a triekosapentaenoinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny linolové a dva acyly kyseliny eikosapentaenové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 2,0 Da, kolizní energie činila 33,0 % a intenzita spektra 1,14 a.u..

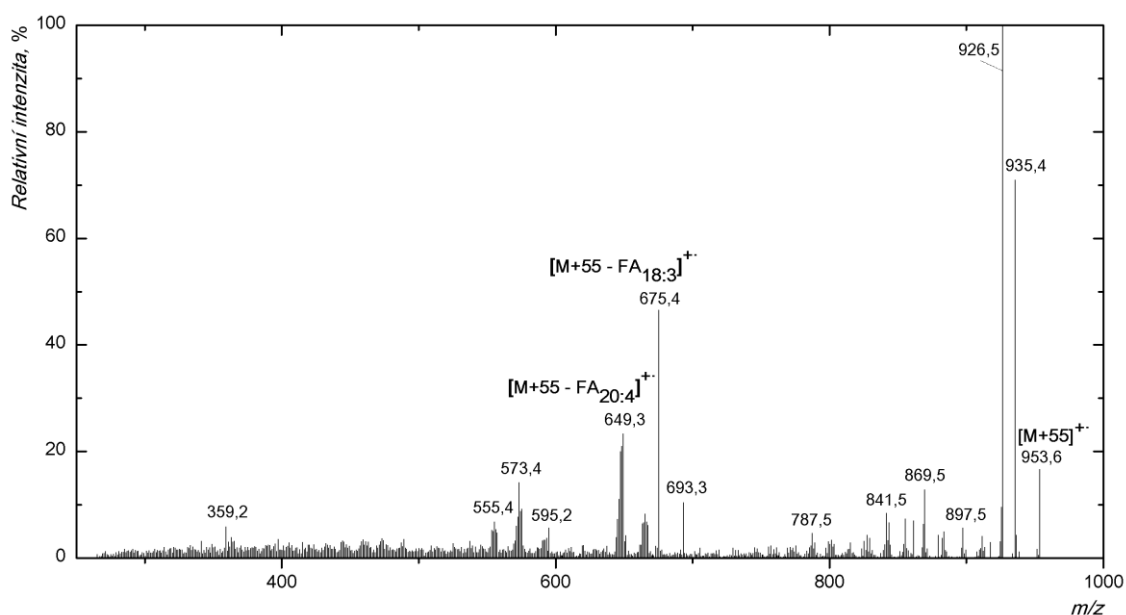


Příloha B75 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trilinoleinu a tridokosaheaeoinu  $[M+55]^{+}$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny dokosaheaeonové a dva acyly kyseliny linolové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,8 Da, kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra 2,37 a.u..

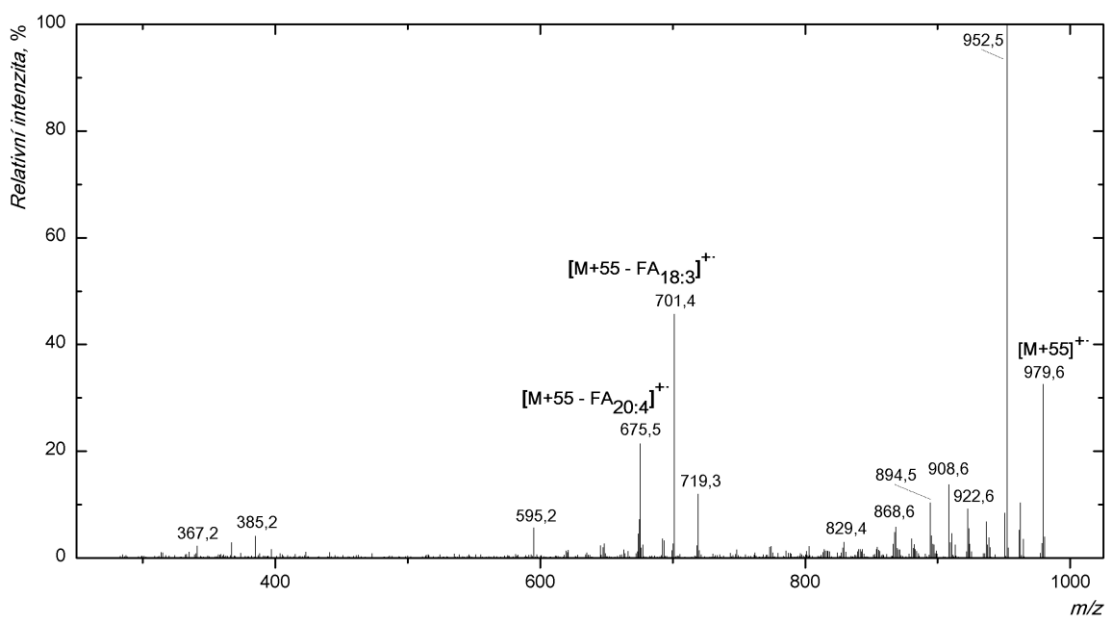


Příloha B76 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trilinoleinu a tridokosaheaeoinu  $[M+55]^{+}$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny linolové a dva acyly kyseliny dokosaheaeonové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 2,0 Da, kolizní energie činila 35,0 % a intenzita spektra 1,45 a.u..

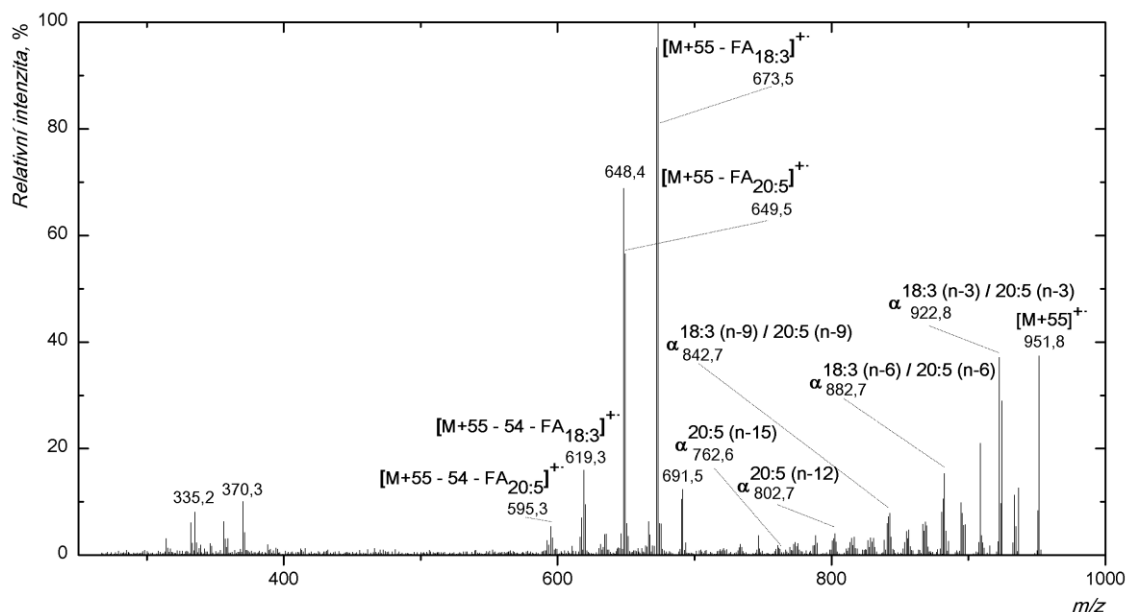




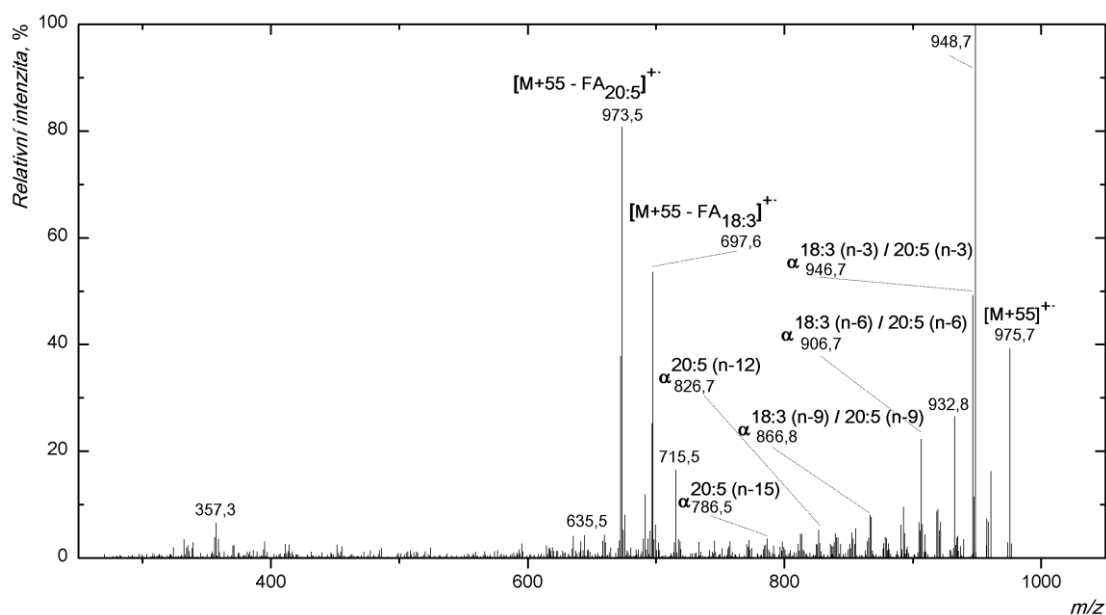
Příloha B77 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trioleinu a triarachidoninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje acyl kyseliny arachidoninové a dva acyl kyseliny alfa linolenové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,2 Da, kolizní energie činila 33,0 % a intenzita spektra  $1,04 \cdot 10^2$  a.u..



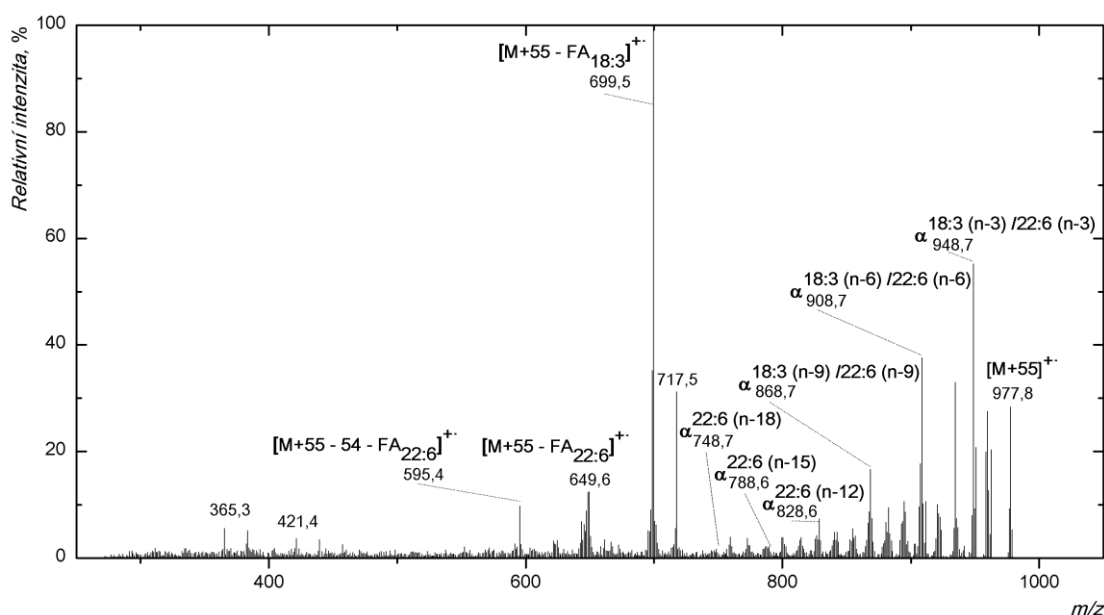
Příloha B78 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trioleinu a triarachidoninu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny alfa linolenové a dva acyl kyseliny arachidoninové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 33,5 % a intenzita spektra  $3,71 \cdot 10^1$  a.u..



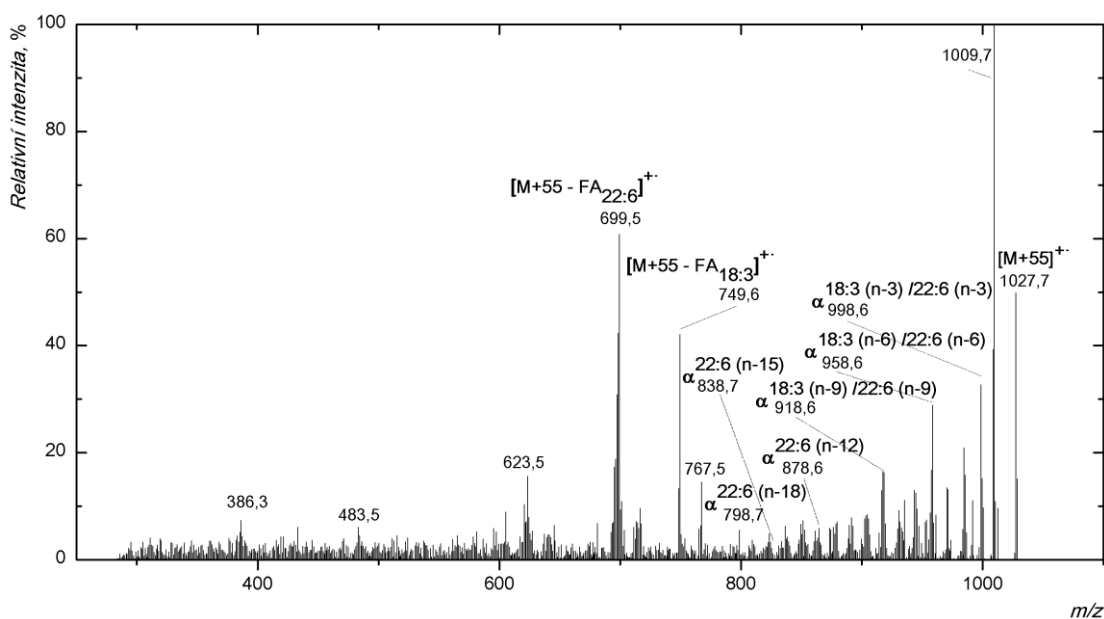
Příloha B79 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trialfa linoleninu a trieicosapentaenoinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny eikosapentaenové a dva acyly kyseliny alfa linolenové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,6 Da, kolizní energie činila 35,5 % a intenzita spektra 8,46 a.u..



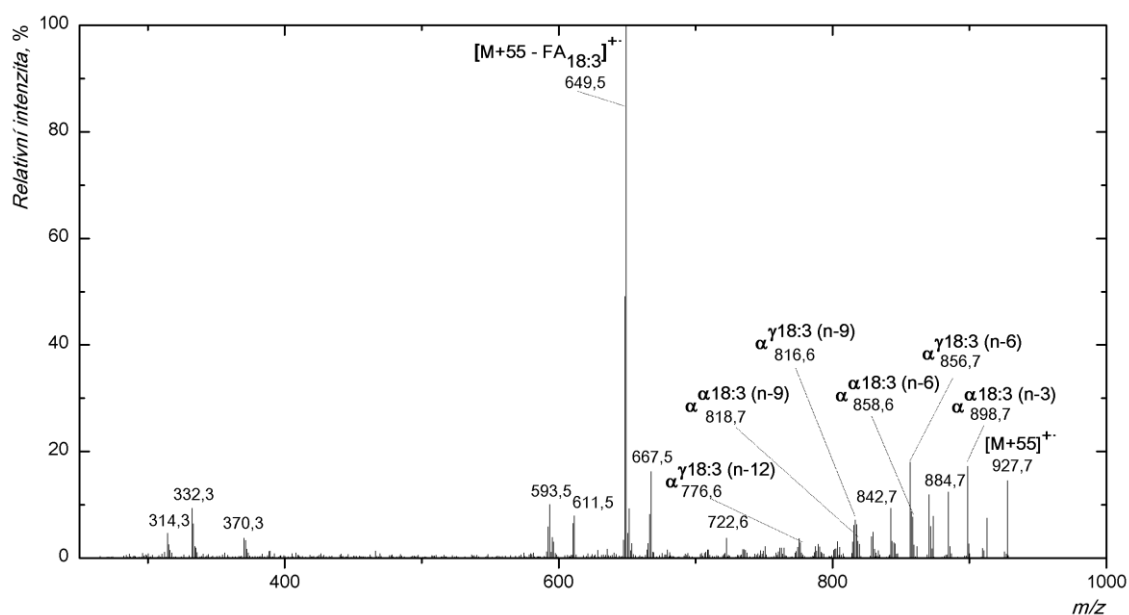
Příloha B80 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trialfa linoleninu a trieicosapentaenoinu  $[M+55]^+$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny alfa linolenové a dva acyly kyseliny eikosapentaenové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,5 Da, kolizní energie činila 35,0 % a intenzita spektra 7,52 a.u..



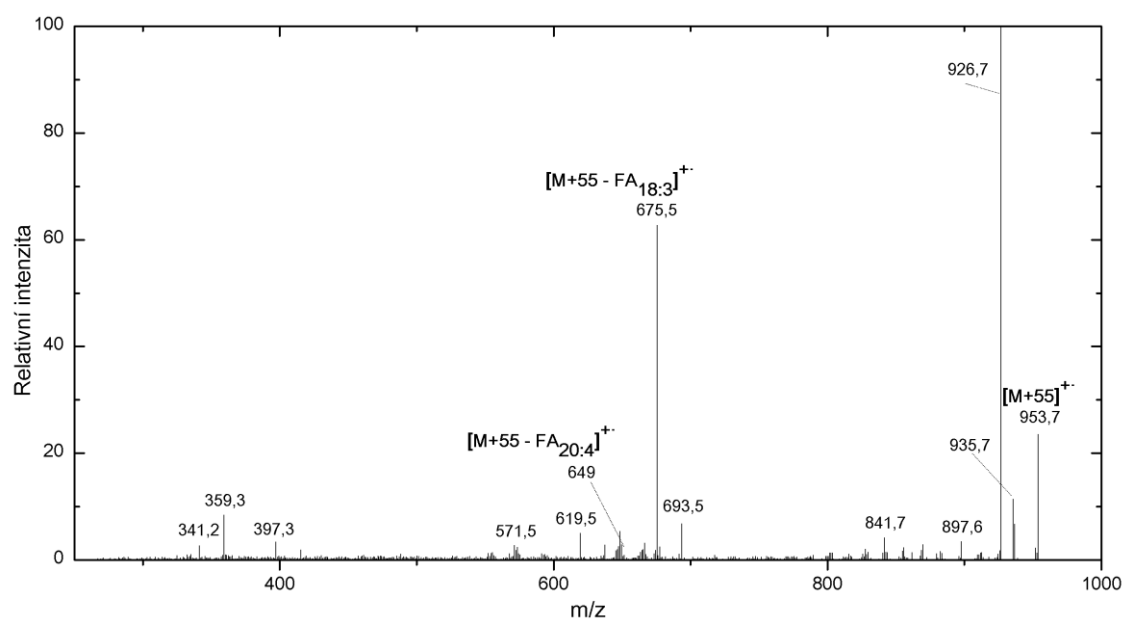
Příloha B81 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trioleinu a tridokosaheaeoinu  $[M+55]^{+}$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny dokosaheaeové a dva acyly kyseliny alfa linolenové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 1,8 Da, kolizní energie činila 35,5 % a intenzita spektra 8,90 a.u..



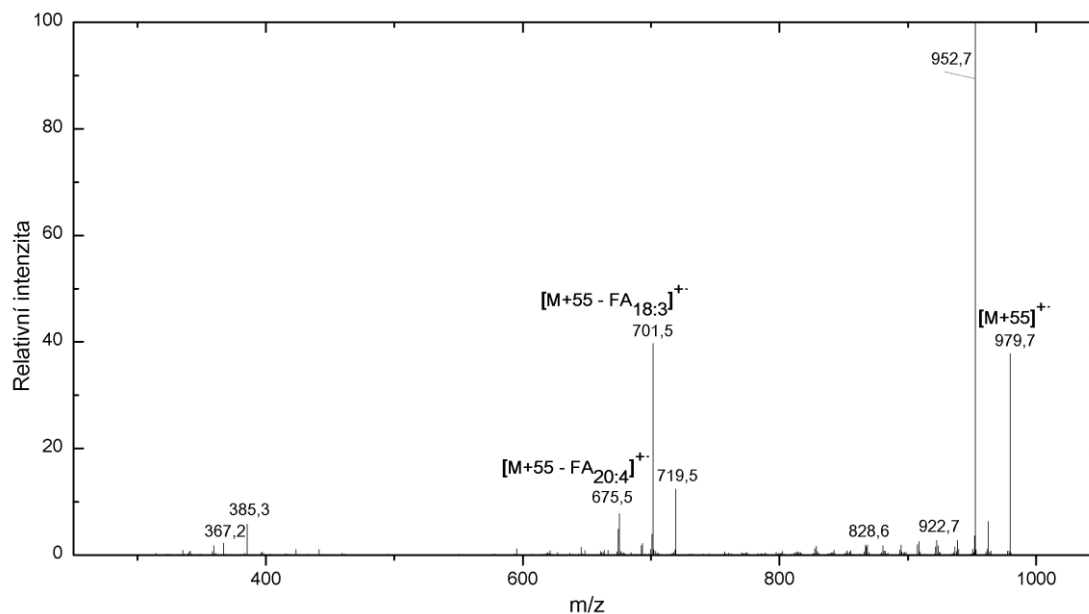
Příloha B82 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trioleinu a tridokosaheaeoinu  $[M+55]^{+}$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny alfa linolenové a dva acyly kyseliny dokosaheaeové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu$ l/min, šířka izolačního okna 1,8 Da, kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra 4,86 a.u..



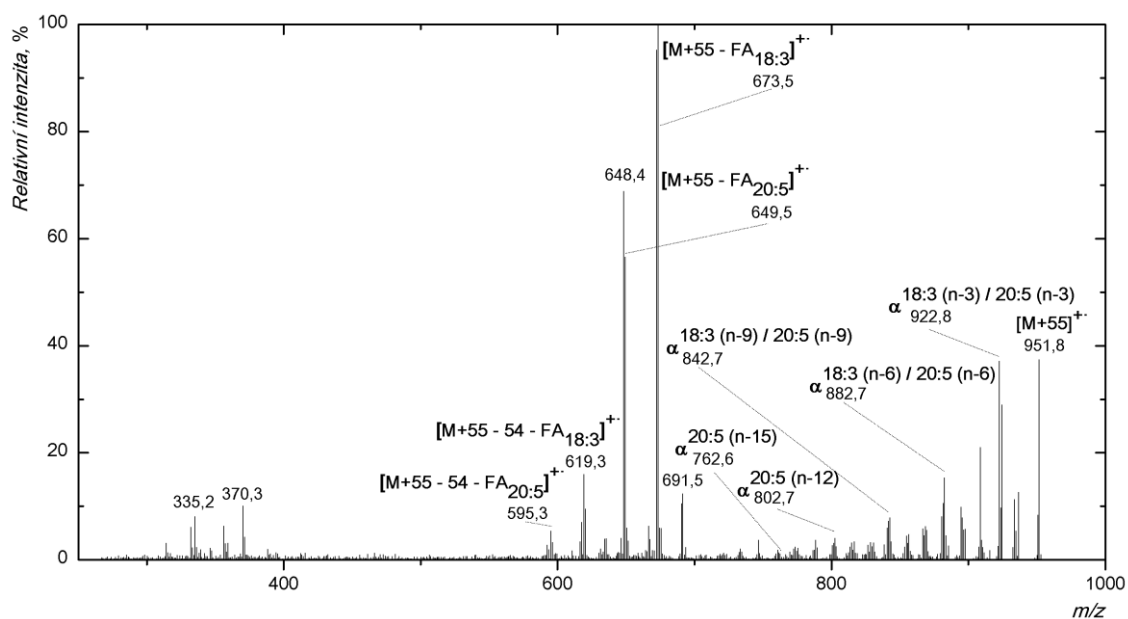
Příloha B83 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trioleinu a triglyceridu linoleninu  $[M+55]^{+}$ . Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,5 Da, kolizní energie činila 36,0 % a intenzita spektra  $1,42 \cdot 10^1$  a.u..



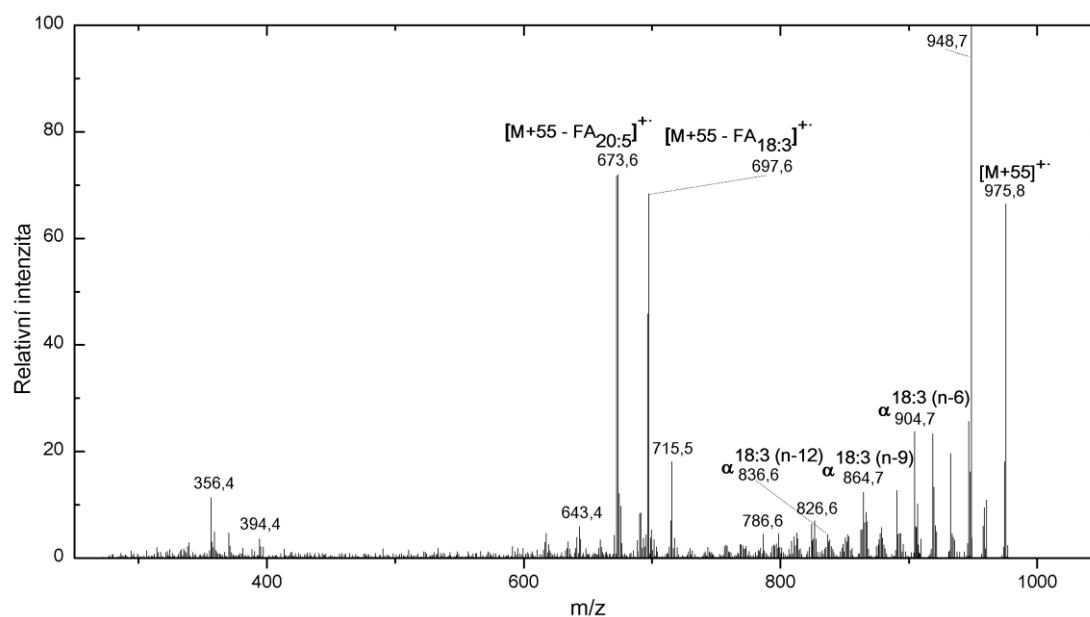
Příloha B84 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi triglyceridu linoleninu a triarachidoninu  $[M+55]^{+}$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny arachidoninové a dva acyly kyseliny gama linolenové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,0 Da, kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra  $2,32 \cdot 10^1$  a.u..



Příloha B85 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trigama linoleninu a triarachidoninu  $[M+55]^{+}$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny gama linolenové a dva acyly kyseliny arachidoninové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,5 Da, kolizní energie činila 34,0 % a intenzita spektra  $7,22 \cdot 10^1$  a.u..



Příloha B86 APCI-MS/MS spektrum (CID) aduktu randomizační směsi trigama linoleninu a triekosapentaenoinu  $[M+55]^{+}$ . TG obsahuje jeden acyl kyseliny eikosapentaenové a dva acyly kyseliny gama linolenové. Mobilní fázi byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,7 Da, kolizní energie činila 36,0 % a intenzita spektra  $1,14 \cdot 10^1$  a.u..



Příloha B87 Randomizační směs trigama linoleninu a triekosapentaenoinu (MS/MS CID hmotnostní spektrum). TG obsahuje jeden acyl kyseliny gama linolenové a dva acyly kyseliny eikosapentaenové. Mobilní fáze byl 100 % acetonitril o průtoku 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , šířka izolačního okna 1,7 Da, kolizní energie činila 36,0 % a intenzita spektra 9,10 a.u..